VERLÄNGERUNG DER AUSSCHEIDUNG VON ROTAVIRUSANTIKÖRPERN MIT DER MILCH FRISCHLAKTIERENDER KÜHE DURCH PARENTERALE VAKZINATION

von
Werner Eichhorn
aus
Penzberg

München 1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545801_0006

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr
Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Prof. Dr. P. A. Bachmann

VERLÄNGERUNG DER AUSSCHEIDUNG VON ROTAVIRUSANTIKÖRPERN MIT DER MILCH FRISCHLAKTIERENDER KÜHE DURCH PARENTERALE VAKZINATION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians Universität
München

von
Werner Eichhorn
aus
Penzberg

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent: Prof. Dr. P. A. Bachmann

Korreferent: Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch

Tag der Promotion: 24. Juli 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	2
2.1.	Immunoglobuline im bovinen Milchdrüsensekret	2
2.1.1.	Stimulierung der Milchimmunglobuline beim Rind durch Vakzination	5
2.1.2.	Stimulierung von Rotavirusantikörpern in der Milch beim Rind durch Vakzination	8
2.2.	Die Verwendung von Immunkomplexen als Antigen	9
2.2.1	Eigenschaften von Immunkomplexen	10
2.2.1.1.	Definition und physikalische Eigenschaften	10
2.2.1.2.	Biologische Eigenschaften	12
2.2.2.	Rezeptoren für Immunkomplexe	14
2.2.3.	In-vivo-Elimination von Immunkomplexen	16
2.2.4.	Immunogene Wirkung von Immunkomplexen	17
2.2.5.	Zelluläre Grundlagen bei der Immunantwort gegen Immunkomplexe	19
2.2.5.1.	Makrophagen	19
2.2.5.2.	Lymphozyten	23
3.	Eigene Untersuchungen	27
3.1.	Material und Methoden	27
3.1.1.	Vakzine	27
3.1.1.1.	Antigene	27
3.1.1.2.	Immunkomplexe	27
3.1.1.3.	Adjuvantien	28
3.1.2.	Tierversuche	29
3.1.2.1.	Tiermaterial	29
3.1.2.2.	Immunisierung	29
3.1.2.3.	Probenentnahmen	30
3.1.3.	Rotavirus-Antikörper-Nachweis	30

Seite

3.1.4. Gelchromatographische Auftrennung der Milchproben 31

3.1.5. Immunelektrophorese 32

3.1.6. Statistische Auswertung der Ergebnisse 33

3.2. Versuche und Ergebnisse 34

Besprechung der Ergebnisse 70

Zusammenfassung 77

Literaturverzeichnis 79

1. Einleitung

Durch Rotaviren verursachte Durchfälle sind bei einer großen Zahl verschiedener Nutz-, Haus- und Wildtierspezies beschrieben worden. Sie treten in der Regel kurz nach der Geburt während der ersten Lebenstage auf und verursachen bei Nutztieren schwere wirtschaftliche Schäden.

Da ein Immunschutz gegen Rotavirusinfektionen nur wirksam ist, wenn spezifische Antikörper im Darmlumen ständig vorhanden sind, die infektiöses Virus neutralisieren, haben humorale Antikörper kaum eine Schutzwirkung. Antikörper im Darmlumen können entweder lokal sezerniert, d.h. aktiv gebildet oder mit der Muttermilch aufgenommen werden. Durch die Infektion mit Rotaviren kurz nach der Geburt ist der Zeitraum für die Ausbildung einer aktiven lokalen Immunität zu kurz, so daß sich die Untersuchungen beim Rind mehr und mehr auf eine Stimulierung von Milchantikörpern, die über längere Zeit ausgeschieden werden, konzentrieren.

Für eine Praxisanwendung ist die Stimulierung einer verlängerten Ausscheidung von Rotavirusantikörpern wohl nur über eine parenterale Applikation von Vakzinen möglich. In der vorliegenden Arbeit sollten neben dem Einsatz verschiedener Adjuvantien im Zusammenhang mit Rotavirusantigen und der Vakzination zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor der Geburt auch die Wirkung der Applikation von Rotavirus/Antikörper-Komplexen auf die Menge und Dauer der Ausscheidung von Rotavirusantikörpern mit Kolostrum und Milch frischlaktierender Kühe untersucht werden.

2. Schrifttum

2.1. Immunoglobuline im bovinen Milchdrüsensekret

Das bovine Milchdrüsensekret enthält qualitativ fast alle Immunoglobulinklassen, die auch im Rinderserum vorgefunden werden. Der Gehalt an Immunoglobulinen verändert sich jedoch während der Laktationsperiode sehr stark. Während noch im präkolostralen Milchdrüsensekret 95% aller Proteine Immunoglobuline darstellen, sind es im Kolostrum noch 78%, 3 - 4 Wochen post partum 17% und gegen Mitte der Laktation nurmehr 7% (DIXON, 1961).

Quantitativ ist IgG_1 sowohl im Kolostrum (78% der Gesamtimmunoglobuline) als auch in der Milch (76%) das bei weitem vorherrschende Immunoglobulin, obwohl lokal in der Milchdrüse kaum IgG_1 gebildet wird (Tabelle 1). Der überwiegende Teil dieser Immunglobulinklasse (97,6%) entstammt dem Serum, wie mit J^{125}-markierten Immunoglobulinen gezeigt werden konnte (NEWBY und BOURNE, 1977). Für diesen Vorgang wurde schon frühzeitig ein selektiver Transportmechanismus verantwortlich gemacht, der nur für IgG_1 gilt (LARSON, 1958). Mittlerweile konnte ein spezifischer IgG_1-Rezeptor an den Epithelzellen des sezernierenden Milchdrüsengewebes nachgewiesen werden, der diese Funktion erfüllt (KEMLER et al., 1975).

In Kolostrum und Milch gesunder Rinder spielt das IgG_2 eine sehr untergeordnete Rolle. Während im Serum beide IgG-Subklassen in ungefähr gleichen Proportionen vertreten sind, beträgt der Anteil von IgG_2 im Kolostrum nur 4,3% und in der Milch 4% der Gesamtimmunglobuline. Lediglich während einer Mastitis steigt das IgG_2 in der Milch prozentual stark an und nähert sich den entsprechenden Verhältnissen im Serum. Es wird vermutet, daß durch eine Entzündung der aktive IgG_1-Transportmechanismus geschädigt und durch eine passive Filtration der beiden Globulinklassen abgelöst wird (BRANDON

et al., 1971). Im Vergleich zu IgG_1 ist die Menge von lokal im Euter synthetisiertem IgG_2 mit ca. 50% relativ hoch. Da der absolute IgG_2-Gehalt in der Milch mit 0,06 mg/ml aber sehr niedrig ist, sollte diese Tatsache nicht überbewertet werden.

IgA erscheint im bovinen Milchdrüsensekret in seiner dimeren Form (11S) oder als sekretorisches IgA, welches zusätzlich zum Dimer die sekretorische Komponente SC aufweist (TOMASI und BIENENSTOCK, 1968). SC wurde zuerst von GROVES und GORDON (1967) aus Kuhmilch isoliert und besitzt ein MW von 70.000 - 86.000. SC wird in den Epithelzellen der sekretorischen Organe synthetisiert und entweder in den Epithelzellen an IgA und IgM-Moleküle gekoppelt oder als freies SC ins Lumen abgegeben. In Kuhmilch liegt freies SC in einer Menge von 8 mg/100 ml vor (MACH und PAHUD, 1971). Seine Bedeutung liegt in der Stabilisierung und Schutzfunktion der beiden sekretorischen Immunglobuline IgA und IgM sowie in der Erhöhung ihrer Haftungskapazität an den Schleimhautoberflächen (PORTER und ALLEN, 1972).

Das IgA des Kolostrums entstammt zu ca. 50% aus dem Serum. Bei der Milch stammen 98% des IgA aus dem Serum. Dabei fällt aber die IgA-Konzentration der Milch nicht so stark gegenüber der Kolostrumkonzentration ab, wie dies bei den übrigen Immunglobulinen der Fall ist. Immerhin gehören 17% der Milchimmunglobuline der IgA-Klasse an. IgA besitzt mit nur 2 Tagen die geringste Halbwertszeit aller Immunglobuline des Rindes (Tabelle 1).

IgM kommt sowohl in Kolostrum wie in Milch in geringerer Konzentration vor als IgA (7,3 bzw. 2,6%), dagegen liegt die IgM-Serumkonzentration mit 12% deutlich über der IgA-Serumkonzentration. Auch im Kolostrum stammen zwei Drittel des nachweisbaren IgM aus dem Serum (NEWBY und BOURNE, 1977). Lokal gebildetes IgM wird ebenso wie IgA mit einer SC-Komponente versehen, es muß dazu jedoch in großem Überschuß freies SC vorliegen, um eine stabile s-IgM Bindung zu erhalten.

Tabelle 1: Vorkommen und Eigenschaften der Immunglobuline der bovinen Milchdrüse (modifiz. nach BUTLER 1971; PORTER 1973; NEWBY und BOURNE 1977)

Klassen und Subklassen	IgG 1	IgG 2	IgM	IgA
Chemisch-physikalische Eigenschaft				
Elektrophoretische Beweglichkeit	Schnelle γ und β_2	γ	β_2	β_2
$S_{20,w}$ +	6,5-7,0	6,5-7,0	18;31;7;	11,2;15,4
Molekulargewicht x 10^3	163	163	900,1030	385
Biologische Eigenschaft				
Halbwertzeit (Tage) im Serum	9,6-18	17,7	4	2
Plazentarer Übergang	-	-	-	-
Übergang von Serum in die Milch (in %)	97,6	51	66,8 im Kolostrum	48 im Kolostrum
Komplementbindung	+	-	+	+
Aminosäurenzusammensetzung	höherer Cystingehalt	mehr basische AS		
Gehalt in mg/ml (%Anteil)				
Serum+	11,6;10,5 (51%)	7,9 (35%)	2,6;2,5 (12%)	0,3;0,8 (2%)
Kolostrum+	32,8;75,0 (78%)	1,9 (43%)	3,2;4,9 (7,3%)	4,4;4,5 (10%)
Milch+	1,15;0,35 (76%)	0,06 (4%)	0,04 (2,6%)	0,25;0,20 (17%)

+ Angaben verschiedener Autoren

2.1.1. Stimulierung der Milchimmunglobuline beim Rind durch Vakzination

Bedingt durch Zusammensetzung und Eigenschaften der Kolostrum- und Milchimmunglobuline des Rindes und den rapiden Abfall der spezifischen Immunglobuline in der Milch innerhalb von 2-3 Laktationstagen, sind Versuche zur Verlängerung der Antikörpersekretion der Milchdrüse folgerichtig. Die häufigsten Versuche mit diesem Ziel wurden schon frühzeitig mit bakteriellen Antigenen (vor allem Staphylokokken) zur Mastitisbekämpfung durchgeführt. Da der Immunschutz nach parenteraler Immunisierung jedoch nur kurze Zeit anhielt, schlossen DERBYSHIRE und HELLIWELL (1962), daß sich damit lediglich die Schwere der Erkrankung verringern läßt, nicht aber deren Entstehung verhindert wird.

Erst nachdem CAMPBELL und PETERSEN (1963) sowie OUTTERIDGE et al. (1968) Plasmazellen in den intraalveolären Drüsenepithelbereichen als Antikörper-produzierende Zellen im Schafeuter identifizierten und somit eine aktive Antikörpersynthese in der Milchdrüse von Wiederkäuern nachgewiesen hatten, war eine lokale Stimulierung des Euterimmunsystems sinnvoll geworden. NORCROSS et al. (1968) konnten durch Injektion von fünf verschiedenen Staphylococcus agalactiae-Antigenen in die supramammären Lymphknoten beim Rind die Bildung von spezifischen IgG- (zum kleinen Teil auch IgA) Antikörpern in der Milch induzieren.

Den bis dahin gebräuchlicheren Weg stellte jedoch die intracisternale Applikation des Impfstoffs dar. McDOWELL und LASCELLES (1971a) erzielten mit dieser Applikationsweise und einem polyvalenten Staphylokokken-Toxoidimpfstoff einen signifikanten Schutz im laktierenden Schafeuter gegenüber einer Testinfektion mit virulenten Erregern. Die gleichen Autoren (McDOWELL und LASCELLES, 1971b) konnten auch nach

einer intracisternalen Immunisierung mit inaktivierten Br. abortus- und S. adelaide-Impfstoffen einen signifikanten Anstieg der Milchantikörper beim Schaf erzielen. Eine anschließende intramuskuläre Boosterung der Schafe ergab jedoch lediglich eine Steigerung der Serumantikörper, aber keine Erhöhung der Milchantikörper.

In einem ähnlichen Versuch gelang es WATSON und LASCELLES (1975) die große Wirkung von Adjuvantien bei solchen Impfversuchen an Wiederkäuern aufzuzeigen. Sie vakzinierten Kühe am ersten Tag der Trockenperiode parenteral mit inaktiviertem S. typhi-Impfstoff, der in Tween 80-Freund's inkomplettem Adjuvans suspendiert war. Andere Kühe wurden am ersten Tag der Trockenperiode parenteral sowie 6, 4 und 2 Wochen ante partum intracisternal mit dem gleichen Impfstoff vakziniert. Eine dritte Gruppe erhielt den Impfstoff nur intracisternal appliziert. Die höchsten spezifischen Milchantikörperwerte wurden über die gesamte Laktationsperiode nach kombiniert parenteral/lokaler Impfstoffapplikation erzielt; erstaunlicherweise lagen jedoch die Werte für die parenteral geimpfte Gruppe über denen der lokal geimpften Tiere. Nach Auftrennung der Milchimmunglobuline zeigte sich, daß die spezifische Antikörperaktivität in der Gruppe der parenteral geimpften Tiere hauptsächlich mit der IgA sowie zum kleineren Teil mit der IgG-Klasse assoziiert war. NEWBY and BOURNE (1977) untersuchten die lokale Immunantwort gegen Schweine-IgG im bovinen Euter nach zweimaliger intracisternaler Applikation zwei und eine Woche praepartum. Sie konnten als lokale Immunantwort des Euters alle Ig-Klassen mindestens bis zum 30. Laktationstag nachweisen. Die lokal gebildeten Antikörper wurden ebenso in nicht-vakzinierten Eutervierteln nachgewiesen. Alle lokal geimpften Tiere reagierten auch mit Serumantikörpern auf die Impfung.

Die Milchdrüse der Wiederkäuer diente außerdem zur experimentellen Produktion großer Antikörpermengen gegen verschiedene Virusantigene. So beschrieben MITCHELL et al. (1967) sowie GUERIN und MITCHELL (1975), daß nach lokaler Applikation von Influenza-, Mumps- und Adenovirus sowie von Tollwutvirus die größte Antikörperaktivität in der IgA-Fraktion gefunden wurde. Neben den über Kolostrum und Milch sezernierten Antikörpern scheinen jedoch auch beim Rind, wie beim Menschen, Antikörper-produzierende Zellen (B-Lymphozyten) in der Milch bei der lokalen Immunität beteiligt zu sein. So wiesen CHANG et al. (1980) mit Hilfe der indirekten Jerne-Technik IgG_1-, IgA-, IgM- und IgG_2-Antikörper-produzierende Zellen in der Milch von Rindern nach, die im Abstand von 3-5 Tagen viermal intramammär mit E. coli-T-4 Phagen immunisiert worden waren. Antikörper-produzierende Zellen, von denen die IgG_1 produzierenden Zellen dominierten, wurden bis zum 32. Tag nach der Impfung festgestellt.

Die bisherigen Untersuchungen zur Stimulierung einer länger dauernden Antikörpersekretion über die Milch der Wiederkäuer lassen folgende zusammenfassende Bewertung zu:

1. die quantitativ wichtigsten Immunglobuline in Kolostrum und Milch sind IgG_1 Antikörper,
2. in der präkolostralen und kolostralen Phase gibt es eine schwache lokale IgA- und IgM-Antikörpersynthese, die überwiegende Menge der Kolostrumantikörper wird jedoch aus dem Serum bezogen,
3. da während der Milchsekretionsphase die Immunglobuline fast ausschließlich aus dem Serum stammen, ist das Euterimmunsystem normalerweise inaktiv,
4. durch mehrmalige, lokale Antigenstimulation oder parenterale und durch Adjuvantien verbesserte Antigenpräsentation kann das lakteale Immunsystem der Wiederkäuer aktiviert und zur lokalen Bildung spezifischer Antikörper

aller Klassen sowie Formation Antikörper-produzierender B-Zellen induziert werden,

5. eine Immunisierung von nur einem Euterviertel führt zur Antikörperantwort und zur Formation Antikörper-produzierender B-Zellen auch in den nicht immunisierten Vierteln.

2.1.2. Stimulierung von Rotavirusantikörpern in der Milch beim Rind durch Vakzination

In einer begrenzten Zahl von Untersuchungen wurden mit unterschiedlichem Erfolg hochträchtige Kühe und Schafe gegen virusbedingte Durchfallserkrankungen, insbesonders Rotavirusinfektionen, geimpft, um eine Ausscheidung von spezifischen Antikörpern mit Kolostrum und Milch über eine längere Zeit zu stimulieren.

Die frühesten Untersuchungen wurden mit inaktivierten Viruspräparationen durchgeführt. MEBUS et al. (1976) impften Kühe in einem Feldversuch mit einer Rota-/Coronaviruskombinationsvakzine und beobachteten einen signifikanten Rückgang der Rotavirusinzidenz bei den neugeborenen Kälbern dieser Herden. Über Qualität und Quantität der Milchantikörper wurden keine Angaben gemacht. WELLS et al. (1978) immunisierten Schafe mit einem inaktivierten ovinen Rotaviruspräparat. Sie konnten auf diese Weise die Milchantikörpertiter in den ersten 10 Laktationstagen deutlich höher halten, als in den nichtimmunisierten Kontrolltieren, die nach 4 Tagen keine Rotavirusantikörper mehr über die Milch ausschieden. Die spezifische Rotavirus-Antikörperaktivität lag bei beiden Gruppen in der IgG-Klasse.

SNODGRASS et al. (1980) impften 10 Färsen zum Zeitpunkt der Besamung und im 7. Trächtigkeitsmonat mit einer inaktivierten Rotavirus-Zellkulturvakzine. Bei den nichtgeimpften Kontrolltieren lag der durchschnittliche Rotavirusantikörper-

titer (Neutralisationstest) bei 1 : 100, wobei die spezifische Aktivität im IgG_1- und IgA-Bereich gefunden wurde. Im Kolostrum der geimpften Tiere lagen die Werte bei 1 : 20.000. Die Aktivität war ausschließlich mit IgG_1-Antikörpern assoziiert. Auch am 28. Laktationstag wiesen die Milchen der geimpften Tiere noch Rotavirusantikörpertiter von 1 : 320 auf. Die Kälber der geimpften Kühe entwickelten jedoch genauso wie die der nichtgeimpften Kühe schwere Durchfälle nach einer Testinfektion am 7. Lebenstag. Lediglich die Inkubationszeit war bei den Kälbern der geimpften Kühe auf 5,3 Tage (gegenüber 2,0) verlängert.

WELLEMANS et al. (1979) wiederum stimulierten Kühe 15 Tage vor und zum Zeitpunkt der Geburt parenteral mit Aluminiumhydroxid-Öladjuvans und konnten auf diese Weise in der Milch spezifische Rotavirus-IgG- und IgA-Antikörper über einen Zeitraum von 20 Tagen induzieren.

2.2. Die Verwendung von Immunkomplexen als Antigen

Mit Immunkomplexen werden in der Regel immunpathogene Veränderungen assoziiert. Immunkomplexe stellen bei einer Reihe von Virusinfektionen, insbesondere chronischen und persistierenden Verlaufsformen, die eigentliche Krankheitsursache dar (THEOFILOPOULOS und DIXON, 1979). Bei dieser im wesentlichen auf die Pathologie ausgerichteten Betrachtungsweise wird häufig verdrängt, daß Immunkomplexe im Verlauf jeder Immunantwort entstehen, während immunpathogene Krankheitsfolgen nur in bestimmten Situationen auftreten (ANONYM, 1977; MAYR, 1974). Im Normalfall sind Immunkomplexe für einen Organismus von Nutzen, z.B. durch Beteiligung an der Neutralisation von Viren, sowie bei der Zellysis (OLDSTONE et al., 1974). Virusinfizierte Zellen werden in der Regel erst nach Komplexierung mit spezifischem Antikörper und Komplement lysiert (SISSONS und OLDSTONE, 1980). Bestimmte Tumorzellen können erst nach

Interaktion mit spezifischem Antikörper durch Killer-Zellen bzw. Makrophagen abgetötet werden (KELLER, 1977).

Immunkomplexen wird darüberhinaus eine immunoregulatorische Rolle zugeschrieben: sie können die Immunantwort unterdrücken oder steigern.

2.2.1. Eigenschaften von Immunkomplexen

2.2.1.1. Definition und physikalische Eigenschaften

Als Immunkomplexe bezeichnet man die Produkte, die aus der Verbindung eines Antigens (löslich oder partikulär, körpereigen oder fremd) mit einem spezifischen Antikörper (ohne Berücksichtigung der Immunglobulinklasse) entstehen. Dabei ist es gleichgültig, ob die Reaktion in vivo oder in vitro stattfindet. Da sich Antigen und spezifischer Antikörper nicht kovalent binden, ist die Reaktion grundsätzlich reversibel. Die Reaktionsprodukte sind heterogen und stehen miteinander im Gleichgewicht.

An dieser Stelle ist es notwendig, einige Begriffe zu klären: Als lösliche Antigene werden z.B. Proteine und Haptene bezeichnet; die meisten Autoren zählen auch Viren zu den löslichen Antigenen. Eine exakte Grenze zu den partikulären Antigenen, z.B. Bakterien oder Erythrozyten, wird jedoch nicht gezogen. Immunkomplexe mit diesen Antigenen sind folgerichtig löslich oder partikulär. Der Ausdruck "unlösliche" Immunkomplexe jedoch sagt nichts über die Art des Antigens aus, da es bei der Komplexierung löslicher Antigene zur Bildung unlöslicher Präzipitate kommen kann. Diese Präzipitationsreaktion, die z.B. bei der Immunodiffusion benützt wird, wird begünstigt, wenn Antigen und Antikörper in äquivalenten Mengen vorliegen.

MANNIK et al. (1971) bestimmten die Sedimentationskonstanten solcher Reaktionsprodukte im Sucrosegradienten. Sie benützten humanes Serumalbumin (HSA, MG 65.000) und anti-HSA-Immunglobulin G-Komplexe mit 5fachem Antigenüberschuß. Dabei fanden sich grundsätzlich neben freiem Antikörper (6,6 S) ein deutlicher Peak mit Komplexen, die eine Sedimentationskonstante von 11 S aufwiesen, sowie heterogene Komplexe von 14 - 22 S. Die 11 S-Komplexe haben die molare Zusammensetzung Ag_1Ak_2. Liegt kein Antigenüberschuß vor, sind die Komplexe instabil und reorganisieren sich einmal als freier Antikörper, zum anderen als 14 - 22 S-Komplexe. Werden die Komplexe mit 20fachem Antigenüberschuß hergestellt, erhöht sich der Anteil der 11 S-Komplexe, während der Anteil der 14 - 22 S-Komplexe abnimmt und der der freien Antikörper konstant bleibt.

Die physikalischen Eigenschaften von Immunkomplexen mit Antigenen höherer Molekulargewichte, z.B. Herpes simplex-Virus (HSV) ändern sich nach NOTKINS (1971) in Abhängigkeit von der verwendeten Antikörperkonzentration. Bei Verwendung eines anti-HSV-Immunserums in verschiedenen Verdünnungen ergeben geringe Antikörpermengen (1:64 verdünnt) eine stark heterogene Population von Immunkomplexen, während große Antikörpermengen (1:2 verdünnt) zur Bildung homogener Komplexe führen. Eine Bildung von Aggregaten, besonders bei Verwendung hoher Antikörperkonzentrationen läßt sich allerdings nicht ausschließen.

Besonders im Hinblick auf eine Aggregatbildung existieren jedoch unterschiedliche Meinungen. RUNDELL und BETTS (1980) benützten für ihre Versuche ebenfalls ein Herpesvirus, das humane Cytomegalievirus (CMV). Bei Zugabe von anti-CMV-IgG zu gereinigtem CMV-Antigen wurden 94% der infektiösen Viruseinheiten neutralisiert. Die Sedimentationseigenschaften der auf diese Weise produzierten Immunkomplexe änderten sich erst nach Inkubation mit Komplement oder anti-IgG-Antikörpern.

Dieses Phänomen beruht auf einer massiven Anlagerung von Komplementkomponenten an die Virusantikörper im Immunkomplex, die sich auch elektronenoptisch darstellen läßt (BERRY und ALMEIDA, 1968), nicht jedoch auf der Bildung von Aggregaten. OLDSTONE et al. (1974) hingegen zeigten, daß Polyomavirus-Immunkomplexe mit nur zwei Antikörpermolekülen pro Virion schneller sedimentierten als Virus allein. Eine Zugabe von Komplement führte schließlich zur Aggregation der Immunkomplexe.

2.2.1.2. Biologische Eigenschaften

Immunkomplexe können infektiös und nicht infektiös sein. In der Regel wird bei der Bindung mit spezifischen Antikörpern die Infektiosität von Viren neutralisiert. Beispiele dafür sind zahlreich, und es sind besonders diese neutralisierenden Antikörper, die in vivo die Grundlage der humoralen Immunität bilden (MAYR et al., 1977).
In vitro wird die Neutralisation der Infektiosität von Viren für den Nachweis von Antikörpern in der Diagnostik genutzt.

Zur Bildung infektiöser Virus-Antikörperkomplexe kommt es bei einer Vielzahl von chronischen und persistierenden Virusinfektionen, z.B. mit dem Laktadehydrogenase-Virus (LDH) und dem Virus der Lymphocytären Choriomeningitis (LCM) bei der Maus, mit Herpes simplex-Virus (NOTKINS, 1971), Flavi-, Alpha- und Bunyaviren (PERIS et al., 1981) sowie mit Cytomegalievirus beim Menschen (RUNDELL und BETTS, 1980). Bei bestimmten Viren, die sich in Makrophagen vermehren (z.B. Dengue-Virus), besitzen die Virus-Antikörperkomplexe eine höhere Infektiosität als das nichtkomplexierte Viruspartikel (HALSTEAD und O'ROURKE, 1977). Dabei scheint die Menge des vorhandenen spezifischen Virusantikörpers keinen Einfluß auf die Infektiosität der Immunkomplexe zu haben. So lassen sich infektiöse HSV-Virus-Antikörperkomplexe durch Virusanti-

körper im Überschuß nicht neutralisieren, wohl aber durch Anti-Immunglobulinseren bzw. durch Komplement (NOTKINS, 1971).

Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Bildung infektiöser Virus-Antikörper-Komplexe und ihre Neutralisierung.

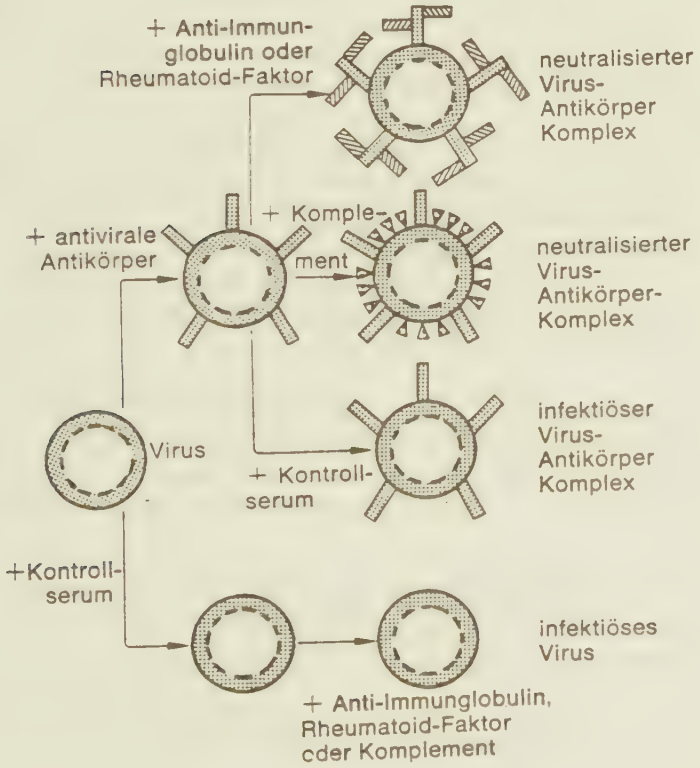

Abb. 1: Unterschiedliche Typen von Virus-Antikörperkomplexen (nach MAYR, 1974)

In vivo sind Immunkomplexe in der Lage, das Komplementsystem zu aktivieren. Dies kann entweder über den klassischen Weg von C 1 aus oder über das Properdinsystem (alternative pathway) von C 3 aus geschehen. Komplexe mit IgM oder bestimmten Subklassen von IgG, beim Menschen IgG_1 und IgG_3 (SISSONS und OLDSTONE, 1980), aktivieren Komplement auf dem klassischen Weg und lagern initial C1q, IgM auch C1r oder C1s, an ihr Fc-Stück an (SIEGEL und CATHOU, 1980). Nach Bildung von C1 aus C1q, r, s wird C4, C2 und C3b angelagert; die terminalen Komponenten C5-9 werden nicht gebunden (MICHL et al., 1979).

Die Aktivierung über das Properdinsystem durch IgD und IgE, insbesondere aber auch durch IgG, ist jedoch mindestens ebenso bedeutend (KELLER, 1977). Die Aktivierung des Komplementsystems durch sekretorisches und monomeres IgA ist zwar beschrieben, gilt aber als ineffizient (STOKES et al., 1980). Nach SILVERSTEIN (1975) zeigt sekretorisches IgA keinerlei Komplementfixation.

Voraussetzung für die Komplementaktivierung durch Immunkomplexe mit IgG als Antikörper ist das Vorhandensein von IgG-Molekülen in enger räumlicher Beziehung auf einem Antigen-Molekül sowie intakte Disulfidbrücken des IgG (MANNIK et al., 1971).

Die Bedeutung der Komplementaktivierung durch Immunkomplexe liegt hauptsächlich in der Lysierung von Zellen, die spezifische Virusantigene auf ihrer Oberfläche tragen.

2.2.2. Rezeptoren für Immunkomplexe

Bisher sind zwei verschiedene Rezeptoren im Organismus nachgewiesen worden, an die sich Immunkomplexe binden können, einmal Fc-Rezeptoren (FcR), zum anderen Rezeptoren für Komplement (KR).

Rezeptoren für den konstanten Teil der schweren Ketten von Immunglobulinen (FcR) finden sich bei B-Lymphozyten (PARASKEVAS et al., 1972), bei Subpopulationen von T-Lymphozyten und Null-Zellen (DICKLER, 1976) sowie bei mononukleären Phagozyten (THEOPHILOPOULOS und DIXON, 1979). FcR sind Ig-Klassen- bzw. Subklassen-spezifisch, binden aber heterologe Immunglobuline bis zu einem gewissen Grad ebenfalls (UNKELESS und EISEN, 1975). Nach AREND und MANNIK (1972) binden Kaninchenmakrophagen nur homologe Immunglobuline.

Praktisch alle Makrophagen besitzen FcR für IgG (FcgR) in großer Menge. So berechneten UNKELESS und EISEN (1975) pro nicht aktivierten Makrophagen 100.000 FcgR. Aktivierte Peritonealmakrophagen weisen sogar 2 x 10^6 FcgR pro Zelle auf (PHILLIPS-QUAGLIATA et al., 1970). Subpopulationen von murinen Peritonealmakrophagen besitzen darüberhinaus auch Rezeptoren für IgM (FcmR) (LAY und NUSSENZWEIG, 1969). ROUBIN und ZOLLA-PAZNER (1979) fanden auch in der Milz und im Knochenmark von Mäusen FcmR-positive Makrophagen.

Dagegen finden sich bei B-Lymphozyten Fc-Rezeptoren sowohl für IgG und IgM als auch für IgA (DICKLER, 1976). Sie stehen möglicherweise in räumlicher und/oder funktioneller Beziehung zu den Oberflächen-Immunglobulinen.
Etwa 30% der T-Lymphozyten besitzen Fc-Rezeptoren für IgG, IgM und IgA, nach Aktivierung der Zellen steigt der Anteil der FcR-positiven Zellen stark an (DICKLER, 1976).

Bei den nicht-B-, nicht-T-Lymphozyten (Nullzellen) sind vor allem die Killer-Zellen FcR-positiv; dies befähigt sie zur Abtötung Antikörper-beladener Zielzellen (KELLER, 1977). CARVALHO und HORWITZ (1980) wiesen in neueren Untersuchungen eine eigene FcR-positive Subpopulation der Nullzellen ("L-Zellen") nach, die für die durch Immunkomplexe vermittelte Lymphozytenproliferation spezifisch verantwortlich sein soll.

Rezeptoren für die Komplementkomponenten C3b und C4b finden sich auf Makrophagen und B-Zellpopulationen, auf letzteren zusätzlich Rezeptoren für C1. T-Zellen und Null-Zellen sind KR-negativ (THEOPHILOPOULOS und DIXON, 1979).

Fc-Rezeptoren und Komplementrezeptoren sind, wie eine Reihe anderer Zellrezeptoren, grundsätzlich in der Membran verankert. Nach Interaktion mit dem jeweiligen Liganden bilden sie flächenhafte Aggregate ("patches") oder Kappen an einem Zellpol ("caps") (SCHREINER und UNANUE, 1977; SULICA et al., 1979).

2.2.3. In-vivo-Elimination von Immunkomplexen

Werden nicht immunen Tieren präformierte, lösliche Immunkomplexe bzw. Antigene und Antikörper oder immunen Tieren Antigene injiziert, werden diese Immunkomplexe deutlich rascher als freies Antigen aus der Zirkulation eliminiert. MANNIK et al. (1971) zeigten, daß sowohl bei Rhesusaffen als auch bei Kaninchen humanes Serumalbumin (HSA)-anti-HSA-Komplexe in Abhängigkeit von der Immunkomplexzusammensetzung eliminiert werden. Immunkomplexe, die mehr als zwei Antikörpermoleküle pro Antigen enthalten, werden rasch eliminiert, Komplexe mit weniger Antikörper pro Antigen sowie freies Antigen und freie Antikörper bleiben länger in der Zirkulation. Eliminationskurven löslicher Immunkomplexe weisen drei Stufen auf. Zunächst werden mit einer sehr kurzen Halbwertszeit Immunkomplexe eliminiert, die mehr als zwei Antikörper enthalten. Anschließend bildet sich ein Gleichgewicht zwischen extra- und intravaskulären kleineren Immunkomplexen und freiem Antikörper aus, die in der dritten Stufe abgebaut werden. Die Halbwertszeiten betragen für die erste Stufe 0,2 Stunden, für die zweite 3,6 Stunden und für die dritte Stufe 40 Stunden (MANNIK und AREND, 1971). Werden die Disulfidbrücken der Antikörper zerstört, fehlt die erste Stufe.

Diese Ergebnisse werden von weiteren Autoren bestätigt. PLOTZ et al. (1979) zeigten, daß die Eliminationsgeschwindigkeit kontinuierlich mit der Menge der Immunglobuline im Immunkomplex ansteigt.

Eliminationsort ist das Retikulo-endotheliale System (RES), insbesondere die Kupfferzellen der Leber, während in Milz, Lunge und Nieren nur wenig Immunkomplexe abgefangen werden. AREND und MANNIK (1971) zeigten bei Kaninchen, daß bei Immunkomplexen mit IgG als Antikörper Komplement für die Elimination nicht nötig ist, wohl aber, wenn IgM als Antikörper im Immunkomplex vorhanden ist.

Mit steigenden Konzentrationen von Immunkomplexen kommt es zur Sättigung der Zellen des RES, so daß auch größere Komplexe mehr und mehr in der Zirkulation verbleiben.

2.2.4. Immunogene Wirkung von Immunkomplexen

Versuche über die immunogenen Eigenschaften von Immunkomplexen werden seit dem vorigen Jahrhundert durchgeführt. Eine historische Übersicht findet sich bei STONER und TERRES (1963). Frühzeitig wurde erkannt, daß Immunkomplexe sowohl immunosuppressiv als auch immunisierend wirken können und daß diese entgegengesetzten Wirkungen vom Verhältnis von Antigen zu Antikörper abhängig sind. TERRES und WOLLINS (1961) injizierten Mäusen Immunserum gegen bovines Serumalbumin (BSA) von Kaninchen und unmittelbar anschließend BSA in verschiedenen Mengen intravenös. Sie fanden, daß Immunkomplexe stärker immunogen sind als unkomplexiertes Antigen, wobei Komplexe, die mit leichtem Antigen-Überschuß hergestellt waren, am besten wirksam waren in der Induktion einer Primärantwort. Ähnliche Ergebnisse erzielten die Autoren bei Verwendung von Tetanus-Toxoid und homologen Antiseren.
Auch hier kam es bei Mäusen zu einer erhöhten Primärantwort nach intravenöser Injektion, wenn die Komplexe im Äquivalenz-

bereich oder im Antigenüberschuß gebildet waren. Nach subkutaner Verabreichung wurde dieses Phänomen jedoch nicht beobachtet. Wurden die Tiere vor der Immunisierung mit Cobalt ^{60} bestrahlt, zeigte sich bei beiden Applikationsarten eine bessere Wirksamkeit von Immunkomplexen im Vergleich zu freiem Antigen. In vivo gebildete Immunkomplexe wirkten wie in vitro präformierte Komplexe. Eine Sekundärantwort wurde dagegen unterdrückt, wenn die Tiere 30 Tage nach der Immunisierung mit Antigen mit Immunkomplexen geboostert wurden.

TERRES et al. (1972) zeigten bei Mäusen, daß Immunkomplexe mit Antigen-Überschuß eine Antigen-Sensibilisierung hervorrufen können. Das Auftreten und die Kinetik von Antikörpern ist denen einer Sekundärantwort vergleichbar. Da durch Injektionen von Immunkomplexen und 3 Tage später von Antigen alleine das gleiche Bild der Antikörper-Produktion erreicht wird, machen die Autoren für die frühzeitige Antigen-Sensibilisierung die Immunkomplexe, für die Antikörper-Produktion das freie Antigen verantwortlich. Dieses freie Antigen bestimmt die Spezifität der Immunantwort.

TERRES et al. (1974) benützten in weiteren Versuchen als kreuzreagierende Antigene verschiedene Albumine. Liegt im Immunkomplex ein anderes Albumin als Antigen vor als ein 3 Tage später appliziertes, so werden nur Antikörper gegen spezifische Determinanten des letzeren gebildet. Immunkomplexe allein rufen in diesem System keine Immunantwort hervor, die Antikörper-Bildung gegen nicht verwandte Antigene wird nicht erhöht.

McBRIDE und SCHIERMANN (1971) untersuchten bei Hühnern die Isoimmunantwort gegen Antikörper-beladene Erythrozyten. Sie fanden eine Verstärkung der Immunantwort gegen freie Determinanten, während die Antikörper-Bildung gegen mit spezifischem Immunglobulin besetzte Determinanten unterdrückt wurde.

HOUSTON et al. (1974) zeigten, daß Immunkomplexe aus VEE-Virus und spezifischem IgG im Äquivalenzbereich (Antikörper-Verdünnung 1 : 160) in Rhesusaffen nach einmaliger Injektion rasch hohe Antikörper-Titer hervorrufen. Komplexe mit Antigen-Überschuß wurden durch 5-fach höhere Antikörper-Verdünnungen, also 1 : 800, hergestellt. Solche Komplexe induzierten ebenfalls eine frühzeitige Antikörper-Bildung, aber die Titer blieben niedriger und fielen rasch ab.

Dagegen fand DENNERT (1971) bei Mäusen, daß mit IgM oder geringen Mengen IgG beladene Erythrozyten die Immunantwort erhöhten, höhere Mengen von IgG jedoch hemmten. Paralell dazu verlief die Anreicherung des Antigens in der Milz. LAISSUE et al. (1971) berichteten ebenfalls über eine Verstärkung der Immunantwort durch komplexiertes Tetanus-Toxoid bei Mäusen. Antikörper-Titer erschienen vier Tage früher und erreichten 14fach höhere Werte als bei Kontrolltieren, die Toxoid allein erhielten.

TERRES und WOLLINS (1961) zogen für die erhöhte immunogene Wirkung von Immunkomplexen deren bevorzugte Bindung an immunkompetente Zellen in Betracht, ohne darüber nähere Auskunft geben zu können. Erst später wurde entdeckt, daß B- und T-Zellen, aber auch Makrophagen und Nullzellen, eine große Anzahl von Fc- und/oder Komplement-Rezeptoren besitzen, mit denen sie Immunkomplexe spezifisch binden können.

2.2.5. Zelluläre Grundlagen bei der Immunantwort gegen Immunkomplexe

2.2.5.1. Makrophagen

Makrophagen spielen bei der Induktion einer Immunantwort gegen thymusabhängige Antigene eine wichtige Rolle bei der Elimination, dem Abbau, der Verarbeitung und der Präsentation des Antigens (UNANUE, 1975).

Daneben geben sie lösliche Stoffe, sog. Mediatoren, ab, die Lymphozytensubpopulationen spezifisch beeinflussen (PIERCE et al., 1974; HOFFMANN, 1980). Ähnliche Funktionen erfüllen neben den Blutmonozyten und den Makrophagen in den sekundären lymphatischen Organen auch die Kupfferzellen der Leber bei der Maus und beim Meerschweinchen (NADLER et al., 1980) sowie Alveolarmakrophagen bei Meerschweinchen, nicht aber bei der Ratte (HOLT und BATTY, 1980).

Nicht komplexiertes Antigen wird von B-Zellen mit "passenden" Paratopen spezifisch gebunden, an die Membran von Makrophagen jedoch lagert es sich unspezifisch an. Wie diese Anlagerung im einzelnen abläuft, ist nicht genau bekannt, ein Bindungsvorgang läßt sich nicht demonstrieren (JONES, 1975). In der Regel wird dieses Antigen anschließend phagozytiert, ein geringer Teil bleibt jedoch an der Zelloberfläche. Dieses membrangebundene Antigen wird für die Aktivierung von Lymphozyten verantwortlich gemacht (UNANUE, 1975).

Eine Antigen-Präsentation kann jedoch auch nach der Phagozytose erfolgen. Ein geringer Teil des aufgenommenen Antigens wird nicht vollständig abgebaut, sondern als Makromoleküle sezerniert, eventuell nach vorheriger Verarbeitung zu "Superantigenen" (GOUDSWAARD et al., 1979). Für einen solchen Verarbeitungsprozeß, über dessen Mechanismus allerdings keine Einzelheiten bekannt sind, sprechen auch die Befunde von ELLNER et al. (1977). Eine Lymphozytenstimulierung durch von Phagozyten bzw. Makrophagen exozytiertes Antigen-Material läßt sich durch Antikörper gegen das native Antigen nicht hemmen, was darauf schließen läßt, daß im Makrophagen eine chemische Modifikation des Antigens stattgefunden haben muß. Exozytose und Lymphozytenaktivierung erfolgen nach Ansicht dieser Autoren nach physikalischem Kontakt von Makrophagen und Lymphozyten.

STEINMANN und COHN (1975) konnten dagegen mit Meerrettich-Peroxidase als Antigen keinerlei Antigen-Präsentation feststellen, das Antigen wurde vollständig phagozytiert und restlos zu Aminosäuren abgebaut.

Werden dagegen diese Antigene mit spezifischen Peroxidase-Antikörpern komplexiert (opsonisiert), so kommt es schnell zur Bindung an die Makrophagenmembran, wobei die Affinität für die Membran 1000fach höher ist als bei Verwendung von freiem Antigen. Immunkomplexe sind größer als native Antigene und größere Proteine binden allgemein besser an die Membran von Makrophagen. Kleinere Proteine zeigen neben ihrer schwächeren Bindung zusätzlich ausgeprägte Dissoziationstendenzen (UNANUE, 1975).

Weit wichtiger für eine Immunkomplexbindung an Makrophagen ist jedoch die Beteiligung der Rezeptoren für das Fc-Stück der Immunglobuline und für Komplement.

Makrophagen binden mit ihren Fc-Rezeptoren neben polymerem auch monomeres (cytophiles) IgG. UNKELESS und EISEN (1975) wiesen bei Mäusemakrophagen einen eigenen Fc-Rezeptor für monomeres und aggregiertes IgG2a sowie einen gesonderten FcR für Antigen-komplexiertes oder aggregiertes IgG1 und IgG2b nach. Der erstgenannte Rezeptor ist Trypsin-empfindlich, der letztere Trypsin-resistent. SULICA et al. (1979) beschrieben bei aktivierten Peritonealmakrophagen der Maus einen Fc-Rezeptor für monomeres IgG der gegen Pronase resistent, für Phospholipase C aber empfindlich ist, sowie weiterhin einen FcR für komplexiertes IgG, der durch Pronase, nicht aber durch Phospholipase C zerstört wird.

Größere Immunkomplexe werden von Makrophagen besser gebunden als kleine; diese Tatsache drückt sich in vivo in der schnelleren Elimination größerer Immunkomplexe aus (MANNIK et al., 1971). PHILLIPS-QUAGLIATA et al. (1970) zeigten, daß für die erhöhte Bindung von Immunkomplexen mindestens zwei Antikör-

permoleküle pro Antigen erforderlich sind und führten die bevorzugte Bindung größerer Immunkomplexe auf die Summation der Bindungsstellen zurück. MANNIK et al. (1971) machen dafür Änderungen im Antikörpermolekül selbst verantwortlich, die durch Antigen-Bindung entstehen. Nach KNUTSON et al. (1977) ist die Interaktion von Immunkomplexen mit dem FcR ein mehrstufiger Vorgang. Initial binden sich Immunkomplexe an einen FcR, wegen der niedrigen Bindungsenergie dissoziieren die meisten aber wieder ab (wie auch monomere Immunglobuline). Einige Immunkomplexe können jedoch zusätzliche Fc-Rezeptoren binden, begünstigt durch die Beweglichkeit der Fc-Rezeptoren in der Zellmembran. Dadurch erhöht sich die Bindungsenergie, bei großen Immunkomplexen kommt es zusätzlich zu einer internen Neuanordnung der Fc-Rezeptoren nach deren Bindung. Damit werden weitere Fc-Rezeptoren verfügbar.

An Fc-Rezeptoren gebundene Immunkomplexe werden nach vorausgehendem Capping rasch phagozytiert (STEINMANN UND COHN, 1975). Dies führt zu einer Reduktion der Bindung weiterer Immunkomplexe und später gebundene Immunkomplexe werden nicht mehr phagozytiert. Nach MICHL et al. (1977) beruht dieses Phänomen auf einem inkompletten Capping des Trypsin-sensitiven FcR, der zwar die Bindung, nicht aber die Phagozytose vermitteln kann. RAGSDALE und AREND (1980) machen für diesen Vorgang eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle verantwortlich, die durch Interaktion von Fc-Rezeptoren mit Immunkomplexen ausgelöst wird. Durch Phosphorylierung oder Aktivierung von Phospholipasen kann dann Zahl oder Funktion freier Fc-Rezeptoren beeinflußt werden.

Bestimmte Subpopulationen von murinen Makrophagen (ROUBIN und ZOLLA-PAZNER, 1979) sowie Glykogen-aktivierte Makrophagen (MANTOVANI, 1981) besitzen Fc-Rezeptoren auch für komplexiertes IgM, die sowohl Bindung als auch Phagozytose vermitteln.

In Anwesenheit von Komplement kann die Bindung auch über den Komplement-Rezeptor erfolgen, da in bestimmten Fällen das Fc-Stück durch Komplement "maskiert" wird und somit für den Fc-Rezeptor nicht mehr verfügbar ist (MICHL et al. 1977).

Eine Bindung über beide Rezeptoren ist in der Regel wesentlich effizienter als die durch einen Rezeptor. MANTOVANI et al. (1972) fanden, daß der Komplementrezeptor normaler Mäusemakrophagen nur die Bindung, nicht aber die Phagozytose von partikulären Immunkomplexen vermitteln kann. Sie schreiben dem Komplementrezeptor eine besondere Rolle in der Antigen-Präsentation bei Makrophagen zu. Bei löslichen Immunkomplexen kann der Komplementrezeptor auch die Phagozytose vermitteln (VAN SNICK und MASSON, 1978). Wenn aktivierte Makrophagen vorliegen, bewirkt der Komplementrezeptor die Phagozytose sowohl löslicher als auch partikulärer Immunkomplexe (MANTOVANI, 1981). GRIFFIN (1980) macht dafür eine Interaktion mit T-Lymphozyten verantwortlich. Dieser Vorgang soll insbesondere im entzündeten Gewebe die Phagozytosefähigkeit der Makrophagen aufrecht erhalten, auch wenn die Phagozytosekapazität der Fc-Rezeptoren erschöpft ist.

2.2.5.2. Lymphozyten

Immunkomplexe können sich an Lymphozyten über Fc-Rezeptoren, an B-Lymphozyten zusätzlich auch über Komplementrezeptoren binden. Bindung über den Komplementrezeptor ist die Regel, da der FcR der B-Lymphozyten nur eine geringe Affinität aufweist und zusätzlich durch Anlagerung von Komplement die Interaktion mit dem Fc-Stück sterisch behindert wird (THEOPHILOPOULOS und DIXON, 1979). Eine Bindung über "passende" Oberflächen-Immunglobuline von B-Lymphozyten ist möglich, aber wegen der geringen Zahl dieser Zellen wenig wahrscheinlich (NUSSENZWEIG, 1974).

Subpopulationen aktivierter T-Lymphozyten sind zur Phagozytose von Immunkomplexen fähig. In der Regel bleiben gebundene Immunkomplexe jedoch für mehrere Stunden an der Oberfläche der Zelle ohne aufgenommen zu werden. Nach Zerstörung von C3b durch Enzyme werden die Immunkomplexe wieder frei. Das lange Verbleiben an der Lymphozytenoberfläche soll zur Immunogenität von Immunkomplexen erheblich beitragen, indem es, wie bei der Antigen-Präsentation durch Makrophagen, Zell-Zell-Interaktionen begünstigt (UNANUE, 1975). Die Bindung von Immunkomplexen kann nach THEOPHILOPOULOS und DIXON (1979) auch suppressorisch wirken, indem z.B. Fc-Rezeptor-positive Suppressorzellen aktiviert werden, Immunkomplexe dann mit der T-B-Zellinteraktion interferieren, oder B-Zellen nach Bindung über den Fc-Rezeptor lösliche Mediatoren bilden. MORGAN und TEMPELIS (1977) zeigten, daß eine Sekundärantwort durch die Komplexzusammensetzung entscheidend beeinflußt wird. Immunkomplexe in Antigen-Überschuß unterdrücken, Komplexe im Äquivalenzbereich stimulieren die Immunantwort, interessanterweise auch gegen nicht verwandtes Antigen. Die Beteiligung von Makrophagen kann in ihrem System allerdings nicht ausgeschlossen werden.

CARVALHO und HORWITZ (1980) konnten diese polyklonale Aktivierung von Lymphozyten allerdings nicht feststellen. Die Bindung von Immunkomplexen führte zu einer Erhöhung der DNS-Synthese bei Lymphozyten des Menschen, nicht jedoch bei der Maus (MÖLLER und COUTINHO, 1975). Nach BERMAN und WEIGLE (1977) können aber auch B-Lymphozyten der Maus durch aggregiertes Gammaglobulin stimuliert werden. Interessanterweise werden dabei höhere DNS-Syntheseraten mit isolierten Fc-Fragmenten erreicht. Fc-Fragmente stimulieren die B-Lymphozyten polyklonal, also unabhängig von der Antigen-Spezifität.

CARVALHO et al. (1980) konnten menschliche Lymphozyten von nicht immunen Spendern mit Immunkomplexen nicht aktivieren, wohl aber Lymphozyten immuner Spender, vorausgesetzt, sie

benützten relativ kleine Mengen komplexierter Antigene. Das Fc-Stück war für die Stimulierung notwendig, da Komplexe mit $F(ab)_2$-Fragmenten ohne Wirkung waren, und die Anwesenheit von Fc-Rezeptor-positiven Zellen erforderlich war. Wie schon beschrieben, sind Makrophagen bei der Aktivierung der Lymphozyten durch Immunkomplexe beteiligt, vermittelt wird sie aber durch L-Zellen (CARVALHO und HORWITZ, 1980). L-Zellen können Immunglobulin-komplexiertes, nicht aber freies Antigen präsentieren. Die Bindung erfolgt nur über das Fc-Stück, da L-Zellen keinen Komplementrezeptor besitzen. Da L-Zellen gebundene Immunkomplexe nicht phagozytieren, ist die Möglichkeit gegeben, daß L-Zellen große Mengen komplexierter Antigene an ihrer Oberfläche konzentrieren können.

Die von BERMAN und WEIGLE (1977) beschriebene polyklonale B-Zellaktivierung durch Immunkomplexe ist ebenfalls Makrophagen-abhängig (MORGAN und WEIGLE 1980a). Sie stellt einen komplexen Vorgang dar. Nach Interaktion mit Immunkomplexen, nicht jedoch mit monomerem IgG, wird das Fc-Stück gespalten. Dabei wird ein Bruchstück mit einem MG von ca. 14.000 frei, welches zur B-Zellaktivierung führt. Zwar sezernieren auch nichtstimulierte Makrophagen ein Enzym, welches die Spaltung des Fc-Stücks bewirkt, dadurch wird jedoch nur eine geringe Stimulation erreicht (MORGAN und WEIGLE, 1980b). Nach MORGAN et al. (1980) sind T-Zellen bei diesem Effekt beteiligt.

Außer IgE können alle Immunglobulin-Klassen eine Proliferation induzieren. Dabei scheinen Speziesunterschiede aufzutreten. Z.B. sind Immunglobuline von Puten nicht wirksam, wohl aber Immunglobuline heterologer Säugerspezies. Puten-Immunglobuline binden sich nicht an Mäuse-FcR (BERMAN et al., 1979).

MORETTA et al. (1977) zeigten dagegen, daß IgG-haltige Immunkomplexe die B-Zellproliferation hemmen. Dafür sind Suppressorzellen (eine T-Zell-Subpopulation) verantwortlich,

die Rezeptoren für IgG besitzen, während Helferzellen z.B. Rezeptoren für IgM besitzen.

Komplement bzw. der Komplementrezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der Antigen-Konzentrierung in den Follikeln von Milz und Lymphknoten (THEOPHILOPOULOS und DIXON, 1979). Immunkomplexe reichern sich in den Keimzentren an (LAISSUE et al., 1971). Allerdings ist nicht klar, ob sie dort von B-Lymphozyten oder dendritischen Zellen gebunden werden (NUSSENZWEIG, 1974). WODA et al. (1980) fanden dagegen eine bevorzugte Bindung von Immunkomplexen an Makrophagen der Milz. Eine Antigen-Konzentrierung in diesen besonders immunoreaktiven Systemen schafft aber in jedem Fall, also unabhängig von der bindenden Zellart, günstige Voraussetzungen für das Zustandekommen von Zell-Zell-Interaktionen. Die durch Komplement vermittelte Verstärkung der Immunantwort durch Immunkomplexe kann aber eventuell auch ohne Beteiligung von Makrophagen ablaufen (SODERBERG und COONS, 1978), während alle anderen beschriebenen Wege die Beteiligung von Makrophagen erfordern. Bei der Antwort auf IgA-haltige Immunkomplexe ist ihre Beteiligung nicht klar (STOKES et al., 1980).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Vakzine

3.1.1.1. Antigene

Zur Vakzine-Herstellung dienten die Rotavirusstämme Nebraska Calf Diarrhea Virus (NCDV) (MEBUS et al., 1969) und München V 1005/78 (BACHMANN und HESS, 1981). Rotavirus wurde in 24 Stunden alten Rollerkulturen der bovinen Nierenzelllinie Aubek nach Standardverfahren (BACHMANN und HESS, 1981) vermehrt. Die Virusernte erfolgte nach 24 - 48 Stunden Bebrütung bei 37° C durch Einfrieren bei -20° C, Auftauen und Zentrifugieren (2200 g, 30 min.). Die Überstände wurden ohne weitere Reinigung zur Vakzine-Herstellung verwendet; sie besaßen einen Infektiositätstiter von $10^{6.5}$ KID_{50}/ml und im Elisa (BACHMANN, 1979) einen Titer von 1 : 40.

Inaktivierte Antigenpräparationen wurden durch Behandlung von Rotavirus mit Formaldehyd im Verhältnis 1 : 1000 (= 0.033 M) 60 Stunden bei 4° C hergestellt. Durch Zugabe einer äquimolaren Menge Natriumbisulfid wurde das Formaldehyd neutralisiert und die Virussuspension anschließend 24 Stunden gegen PBS dialysiert.

3.1.1.2. Immunkomplexe

Immunserum gegen bovines Rotavirus Stamm München V 10/78 (BACHMANN und HESS, 1981) wurde in einem durch Kaiserschnitt entwickelten, kolostrumfrei aufgezogenen Kalb hergestellt. Das Tier wurde im Alter von 5 Tagen oral mit aus Kot über 10 - 50% Sucrose- und anschließendem CsCl-Dichtegradienten gereinigtem Virus infiziert, dann dreimal im Abstand von zwei

Wochen subkutan mit 1 ml derselben Virussuspension geboostert. Der Elisa-Titer des Serums betrug 1 : 2560, der Neutralisationstiter 1 : 640.

Zur Herstellung der Immunkomplexe wurden 90 ml Virusvakzine mit 10 ml Immunserum, das 1 : 10 in PBS vorverdünnt worden war, gemischt und über Nacht bei 4° C belassen. Im Rota-Antikörper-Elisa wiesen die Immunkomplexe Titer von 1 : 16 bis 1 : 32 auf, im Rota-Antigen-Elisa wurde keine Aktivität festgestellt.

3.1.1.3. Adjuvantien

Als Adjuvantien wurden Aluminiumhydroxid ($Al(OH)_2$), eine Öl-in-Wasser-Emulsion (PD-Adjuvans), hochgereinigtes Saponin (Quil A), Liposomen und der Paramunitätsinducer Pind-Avi verwendet.

2%iges $Al(OH)_2$ (Behringwerke, Marburg) wurde 1 : 8 in PBS verdünnt und nach Vermischen mit der Antigenlösung über Nacht bei 4° C belassen.
PD-Adjuvans besteht aus einer Öl-in-Wasser-Emulsion. Es wurde von der Fa. Philips-Duphar (Weesp, Holland) zur Verfügung gestellt.
Die jeweils verwendeten Mengen von $Al(OH)_2$ und PD-Adjuvans sind bei den einzelnen Versuchen angegeben.

Liposomen - spärische Partikel aus Phospholipiden - wurden in Anlehnung an die von GREGORIADIS et al. (1974) beschriebene Methode hergestellt. Für 100 ml Vakzine wurden 1mM L-α-Lezithin, 0,286 mM Cholesterin und 0.143 mM Dicetyl-Phosphat (Sigma, München) in 5 ml Chloroform gelöst. Durch N_2-Begasung wurde das Chloroform verdampft und so ein trockener Lipidfilm an der Gefäßwand hergestellt. Nach Zugabe der Antigenlösung wurde ca. 15 Minuten lang im Eisbad beschallt (3 Amp., 20 KHz).

Quil A[+)] - ein hochgereinigtes Saponin (DALSGAARD, 1978), bei dem die immunpotenzierende Wirkung der Saponine erhalten, deren toxische Wirkung jedoch eliminiert ist - wurde in der Konzentration von 1 mg (in PBS gelöst und sterilfiltriert) pro Applikation verwendet.

Pind-Avi, ein lyophilisiertes Präparat, enthält ein attenuiertes und durch Gammastrahlen inaktiviertes Hühnerpockenvirus, Stamm HP-1, und entsprechende Stabilisatoren (MAYR und BRUNNER, 1980). Es wurde in aqua dest. gelöst appliziert.

Als Plazebos und Kontrollpräparationen dienten Zellkulturmedium (Earle's MEM) mit 1%fötalem Rinderserum, Rotaimmunserum (1 : 10 verdünnt) mit PD-Adjuvans sowie nichtinfiziertes Aubek-Zellkulturmaterial. Die Zellen wurden bei -20° C eingefroren und nach dem Auftauen 30 Minuten lang bei 2200 g zentrifugiert. Für die Immunisierung wurde der Überstand mit einem Zusatz von 1% Rotavirus-Immunserum eingesetzt.

3.1.2. Tierversuche

3.1.2.1. Tiermaterial

In zwei Beständen in Bayern sowie in einem Bestand in Baden-Württemberg standen Kühe unterschiedlichen Alters sowie Färsen der Rassen Deutsches Fleckvieh, Braunvieh und Schwarzbunt zur Verfügung. Die Tiere wiesen eine Milchleistung von über 5000 Litern auf. Insgesamt wurden in diesen Beständen von Anfang 1980 bis zum Frühjahr 1981 119 Tiere geimpft.

3.1.2.2. Immunisierung

Die Tiere wurden - nach Beständen getrennt - nach folgendem Schema immunisiert:

+) Quil A wurde dankenswerterweise von Prof. Dr. K. Dalsgaard, Lindholm, Dänemark, zur Verfügung gestellt.

I. 1. Vakzinierung 14 Tage vor dem errechneten Abkalbetermin, 2. Vakzinierung am Tag der Geburt.

II. 1. Vakzinierung beim Trockenstellen (ca. 6-8 Wochen vor dem errechneten Abkalbetermin, 2. Vakzinierung am Tag der Geburt.

Die Impfungen erfolgten subkutan. Die verwendeten Mengen an Antigen, Immunkomplexen bzw. Adjuvantien sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

3.1.2.3. Probenentnahmen

Blutproben wurden jeweils bei der Immunisierung aus der Vena jugularis entnommen.

Die Entnahme von Milchproben erfolgte am Tag der Kalbung (= Tag 1), dann an den Tagen 2,3,4,5,7,14 und 21 post partum. Die Proben wurden sofort bei -20° C tiefgefroren. Für den Nachweis von Rotavirusantikörpern wurden die Milchen durch niedertourige Zentrifugation (2200 g, 30 Minuten) entfettet. Milchserum wurde durch Zentrifugation bei 17.000 g (2 Stunden, 4° C) gewonnen.

3.1.3. Rotavirus-Antikörper-Nachweis

Der Nachweis von Antikörpern gegen Rotavirus in Serum und Milchserum erfolgte mit Hilfe des Enzyme-linked-immunosorbent assay (Elisa) nach der von BACHMANN et al. (1979) beschriebenen Methode als "blocking Test".

Als Antigen diente ein in Aubek-Zellkulturen vermehrtes Rotavirus, Stamm NCDV in der 7. Passage, das nach Fluocarbonbehandlung 90 min. bei 30.000 Upm sedimentiert wurde. Das Antigen wurde in Karbonat/Bikarbonatpuffer, pH 9,6, verdünnt (1 : 1000) und in 100 µl-Mengen in die Vertiefungen von Flachbodenplatten (M 129 A, Flow Laboratories, Bonn) pipet-

tiert. Die Platten wurden 3 Stunden bei 37° C, anschließend 16 Stunden bei 4° C inkubiert und dann bei -20° C aufbewahrt.

Nach dreimaligem Waschen der Platten mit NaCl-Phosphat-Puffer, dem 0,05% Tween 20 zugesetzt worden war, erfolgte die Beschickung der Vertiefungen mit in log 2-Schritten in NaCl-Phosphat-Puffer verdünnten Serumproben (100 µl, Ausgangsverdünnung 1 : 10) und anschließende Bebrütung bei 37° C während 60 Minuten. Als Kontrolle lief jeweils ein Rotavirusantikörper-positives und ein -negatives Serum mit. Nun folgte erneutes Waschen und Beschicken der Platten mit 100 µl eines Antirotavirus-Meerrettichperoxidase-Konjugates, das nach der Methode von AVRAMEAS und TERNYCK (1971) hergestellt und 1 : 2000 in NaCl-Phosphat-Puffer mit 5% fötalem Rinderserum verdünnt worden war. Nach einer Bindungszeit von 60 Minuten bei 37° C und dreimaligem Waschen erfolgte die Zugabe von 100 µl Substrat (0.5 g/l p-Phenylendiamin (Sigma, München) in Citrat/Phosphat-Puffer, pH 6,0, dem unmittelbar vor Gebrauch 0.005% H_2O_2 zugesetzt wurden). Die Ablesung wurde nach 60 Minuten bei Zimmertemperatur direkt durch Messung der Extinktion mit Hilfe eines Multiscan-Photometers (Flow Laboratories, Bonn) bei einer Wellenlänge von 510 nm vorgenommen. Als positiv wurden die Verdünnungen bezeichnet, deren Extinktion kleiner war als 50% des Extinktionswertes der negativen Kontrolle (Mittelwert aus acht Vertiefungen).

3.1.4. Gelchromatographische Auftrennung der Milchproben

Von je 4, in Ausnahmefällen von 3, Tieren mit gleichem Immunisierungsschema wurden die Milchseren gepoolt. 2 ml des Kolostrum-Pools bzw. 4 ml gepoolter Milchseren der Laktationstage 7 und 21 wurden auf eine Sephacryl S 300-Säule (2,5 x 100 cm) gegeben (Pharmacia, Freiburg). 15 ml Fraktionen wurden mit 0,2 M Phosphatgepuffertem 0,15 M NaCl (pH 7.4) bei einer

Durchflußgeschwindigkeit von ca. 15 ml pro Stunde eluiert. Die optische Dichte zeichnete ein Uvicord II Spektrometer (LKB, Bromma, Schweden) auf. Ausgewählte Fraktionen wurden durch Ultrafiltration 10-fach konzentriert und im Elisa auf Rotavirusantikörper sowie in der Immunelektrophorese auf das Vorhandensein von IgG, IgM und IgA untersucht.

3.1.5. Immunelektrophorese

Der Nachweis der Immunglobulinklassen erfolgte nach der von GRABAR und WILLIAMS (1952) beschriebenen Methode. 0,03 M Barbital-Barbital-Natrium (Serva, Heidelberg), 0,065 M Natrium-Azetat-Puffer wurde mit 0,1 N HCl auf pH 8,2 eingestellt.

2 Teile Puffer wurden dann mit einem Teil aqua dest. verdünnt. In 100 ml verdünntem Puffer wurde 1,5 g Agarose (reinst, Serva, Heidelberg) gelöst und autoklaviert. Mit dieser Agaroselösung wurden Glasplatten beschichtet. Nach dem Erstarren wurden Löcher für die zu untersuchenden Fraktionen sowie Gräben für die spezifischen Antiseren ausgestanzt. Nach Einfüllen der Fraktionen erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einer Flachbettkammer (FBE 3000, Pharmacia, Freiburg) bei einer Spannung von 1,4 Volt/cm über zwei Stunden. Dann wurden die Antiseren gegen bovines IgG, IgA, bzw. IgM (H-kettenspezifisch)[+)] in die Gräben pipettiert. Nach 16 Stunden Inkubation in einer feuchten Kammer wurden die Glasplatten 48 Stunden in 0,9% NaCl-Lösung gewaschen, um nicht präzipitiertes Protein zu entfernen. Danach wurden die Präparate getrocknet, dann in 2% Essigsäure fixiert. Die Färbung der Präparate erfolgte mit 0,5% Amidoschwarz in

---

+) Die Antiseren wurden dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. T. Newby, Bristol, Großbritannien, zur Verfügung gestellt.

Methanol-Essigsäure (90 Teile Methanol, 10 Teile 2%ige Essigsäure) für 5 Minuten. Anschließend wurden die Platten mit Methanol-Essigsäure entfärbt bis sich keine Schlieren mehr bildeten.

3.1.6. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Sämtliche statistischen Operationen wurden mit den reziproken Elisatitern durchgeführt; auch im Text sowie in den Tabellen und Abbildungen[+)] sind die reziproken Werte angegeben.

Zur Berechnung des geometrischen Mittels wurden die Werte logarithmiert (natürlicher Logarithmus zur Basis e, = ln). Für <10 wurde 5 eingesetzt. Aus diesen logarithmierten Werten wurde das arithmetische Mittel gebildet (= $\bar{x}_{ln}$) und delogarithmiert ($e^{\bar{x}}ln$). Zusätzlich ist in den Tabellen als Streuungsmaß die Standardabweichung der logarithmierten Werte (= s_{ln}) angegeben.

Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des U-Tests (Mann-Whitney-Wilcoxon-Test) auf ihre Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ untersucht (ANONYM, 1976).

+) Alle Abbildungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms GRAFFITI (Jürgen Plate, München 1979) hergestellt.

3.2. Versuche und Ergebnisse

Alle Seren der in diesem Feldversuch untersuchten Tiere wiesen zum Zeitpunkt der Erstimmunisierung Antikörper gegen Rotavirus auf. Die ELISA-Titer schwankten zwischen 10 und 1280. Abbildung 2 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Serumtiter.

Bei 9 von 13 untersuchten Serumpaaren der Kontrolltiere, die Aubek-Zellmaterial mit Rotaimmunserum oder Zellkulturmedium mit fötalem Kälberserum (FKS) erhielten, waren die

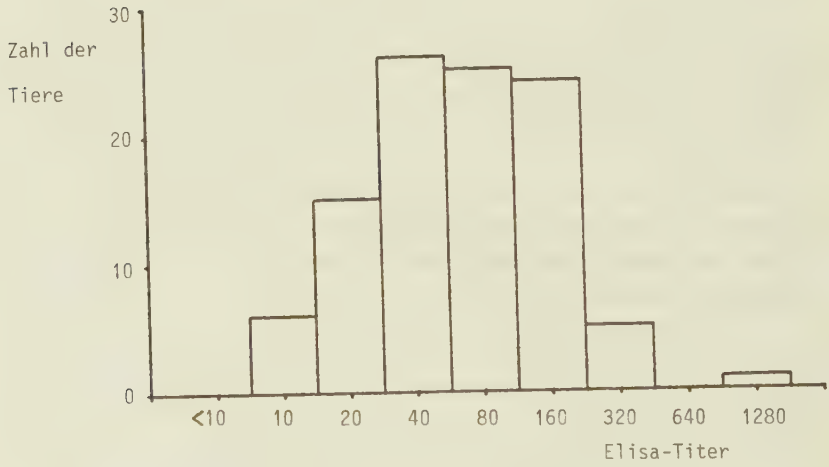

Abbildung 2: Vergleich der Rotavirusantikörpertiter in den bei der Erstimmunisierung gewonnenen Seren (n= 101).

Serumantikörpertiter zum Zeitpunkt der Geburt verglichen mit dem Erstimmunisierungszeitpunkt unverändert. Dagegen fielen bei zwei Tieren die Serumtiter um zwei Stufen.

Die Kolostrumtiter der Tiere, die Aubek-Zellmaterial erhalten hatten (Gruppe I, n = 10), lagen zwischen 10 und 2560 (geometrisches Mittel: 367) (Tab. 2).

Tab. 2: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 10 Tieren der Gruppe I (Aubek-Zellmaterial)

d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen
n.u. = nicht untersucht

Tier-Nr.	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	7	14	21	d
4	80	160	640	10	10	10	17
8	10	n.u.	80	<10	<10	<10	14
12	160	n.u.	2560	10	<10	<10	26
16	10	20	320	<10	<10	<10	14
20	80	20	320	<10	<10	<10	25
24	20	40	1280	20	<10	<10	18
108	160	40	1280	10	10	<10	27
112	40	40	10	<10	<10	<10	19
128	40	20	160	<10	<10	<10	19
132	40	20	1280	10	<10	<10	23
geometrisches Mittel:			367	7,5	5,7	5,3	
$\bar{x}_{ln}$			5,9	2	1,7	1,67	
s_{ln}			1,65	0,48	0,29	0,21	

Am 7. Laktationstag waren in der Milch noch bei fünf Tieren Rotavirusantikörper nachweisbar, das geometrische Mittel der Titerwerte sank aber auf 7,5. Nach 14 Tagen schieden noch zwei Tiere Antikörper mit einem Titer von 10 aus, am 21.Tag nur mehr ein Tier (I/4).

In den Abbildungen 3, 4 und 5 ist der Verlauf der geometrischen Mittelwerte der Antikörpertiter bei den Kontrolltieren und geimpften Tieren dargestellt.

Im Kolostrumpool dieser Gruppe (Titer 320) fanden sich Antikörper gegen Rotavirus nur im 2. Peak. Bei einem Titer von 128 war die Aktivität ausschließlich mit IgA assoziiert (Abb. 6). Die Sammelmilch des 7. Tages wies nurmehr einen Titer von 4 auf. Nach Auftrennung fanden sich Antikörper gegen Rotavirus mit Titern zwischen 2 und 8 im 2., 3. und 4. sowie im 6. Peak. Der Milchpool des 21. Tages wies ebenfalls einen Titer von 4 auf. Rotavirusantikörper mit Titern von 2 fanden sich in den Peaks 2 bis 4.

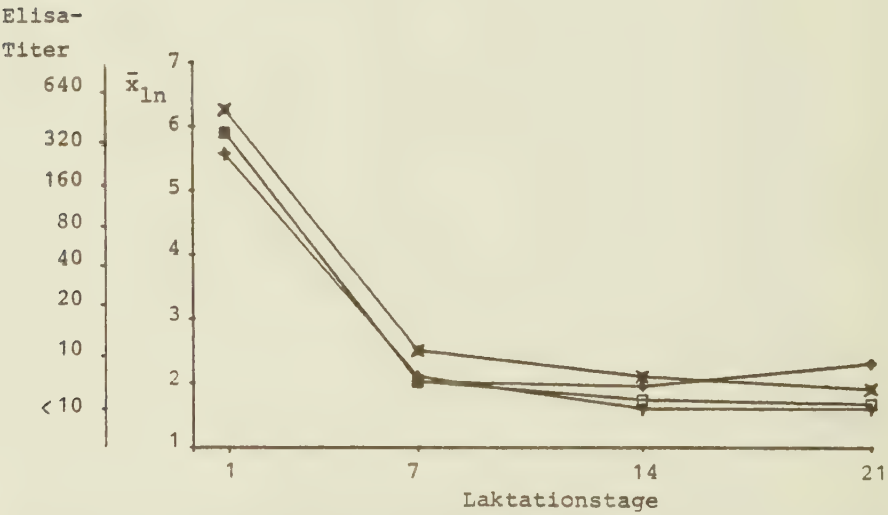

Abbildung 3: Vergleich der Rotavirusantikörpertiter (geometrische Mittelwerte) in Kolostrum und Milch frischlaktierender, parenteral immunisierter Kühe.

Gruppe I — Gruppe V

Gruppe XI — Gruppe IV

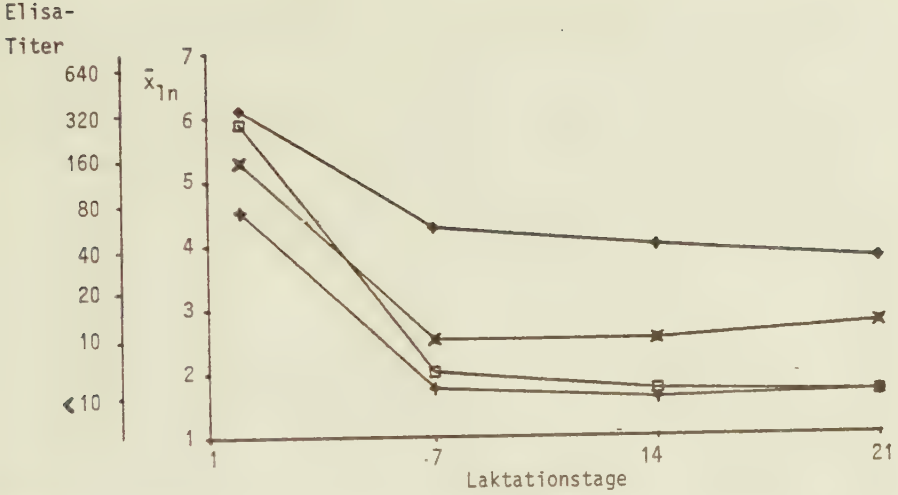

Abbildung 4: Vergleich der Rotavirusantikörpertiter (geometrische Mittelwerte) in Kolostrum und Milch frischlaktierender, parenteral immunisierter Kühe.

Gruppe I — Gruppe VI
Gruppe XIII — Gruppe III

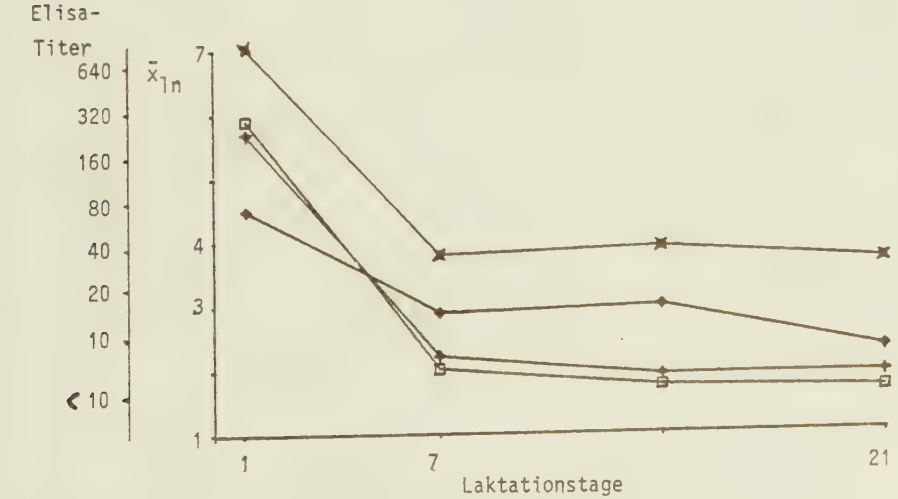

Abbildung 5: Vergleich der Rotavitrusantikörpertiter (geometrische Mittelwerte) in Kolostrum und Milch frischlaktierender, parenteral immunisierter Kühe.

Gruppe I — Gruppe XIV
Gruppe XVI — Gruppe VIII

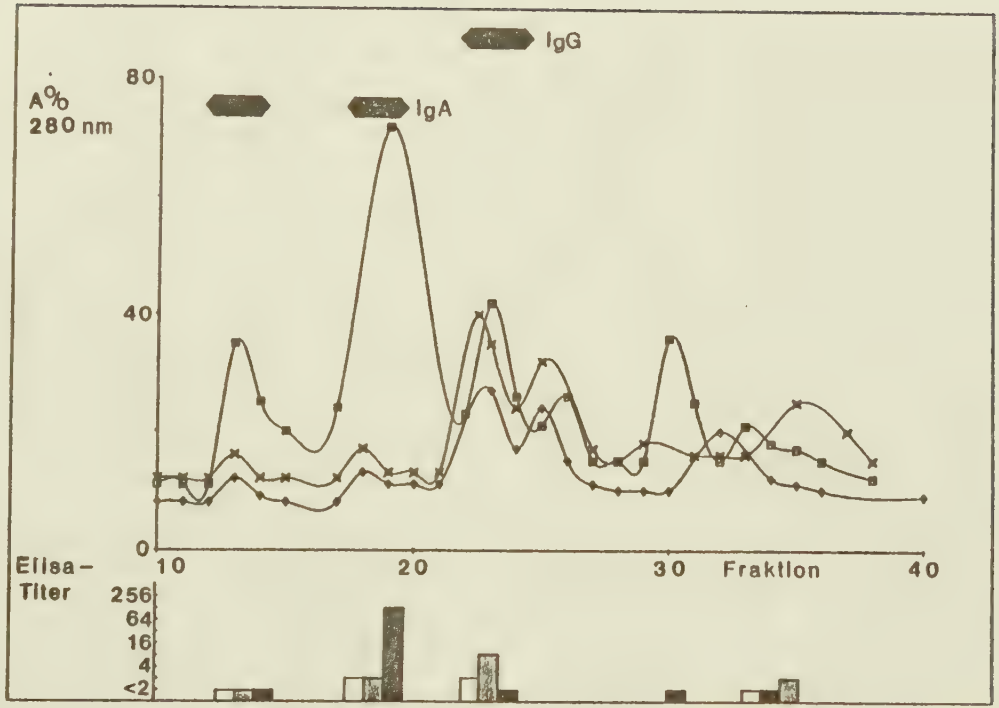

Abbildung 6: Gelchromatographische Auftrennung von Kolostrum und Milch der Tage 7 und 21 von 4 Tieren der Gruppe I. Im oberen Bildabschnitt sind die Immunglobulinklassen durch Balken dargestellt. Die Elisa-Titer der Eluatfraktionen sind in der unteren Bildhälfte durch Säulen dargestellt.

Kolostrum 7-Tage-Milch 21-Tage-Milch

Einen ähnlich rapiden Abfall der Milchantikörpertiter wies die Kontrollgruppe auf, der MEM mit FKS appliziert wurde (Gruppe II, n = 3). Die Titer lagen im Kolostrum zwischen 160 und 1280 mit einem geometrischen Mittel von 640 (Tab. 3). In der Milch des 7. Tages waren noch bei allen Tieren Antikörper vorhanden, der geometrische Mittelwert war jedoch auf 20 gesunken. Am 14. sowie am 21. Tag wies nur noch ein Tier Rotavirusantikörper in der Milch mit einem Titer von 10 auf.

Tab. 3: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 3 Tieren der Gruppe II (MEM mit FKS)
d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	2	3	4	5	7	14	21	d
204	160	80	1280	1280	320	80	10	40	<10	<10	25
208	160	80	160	160	80	20	40	10	<10	<10	27
212	40	80	1280	320	160	40	40	20	10	10	21
geometrisches Mittel:			640	403	160	40	25	20	6,3	6,3	
$\bar{x}_{ln}$			6,46	6,0	5,0	3,7	3,2	2,99	1,84	1,84	
s_{ln}			0,94	1,05	0,69	0,69	1,3	0,7	0,55	0,55	

Bei den Tieren der Gruppe III (n = 9), denen nur 10 ml Adjuvans-PD verabreicht worden war, waren die Rotavirusantikörpertiter im Serum zum Zeitpunkt der Geburt gegenüber den Werten bei der Erstimmunisierung kaum verändert. Lediglich ein Tier wies während dieses Zeitraums einen Titerabfall von zwei Verdünnungsstufen auf (Tab. 4).

Tab.4 : Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 9 Tieren der Gruppe III (Adjuvans-PD)

d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen
n.u. = nicht untersucht

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	2	3	4	5	7	14	21	d
303	n.u.	80	640	640	20	10	<10	<10	<10	<10	23
306	20	20	640	40	<10	<10	<10	<10	<10	<10	18
312	20	40	20	80	<10	<10	<10	<10	<10	<10	17
315	20	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	11
316	10	n.u.	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	30
324	80	40	1280	160	20	20	20	10	<10	10	22
327	160	160	160	80	10	10	10	10	<10	<10	17
330	320	80	40	20	20	10	<10	<10	<10	<10	9
351	40	20	160	40	20	10	10	<10	<10	<10	16
geometrisches Mittel:			93	43	10	7,3	6,8	5,8	5,4	5,4	
$\bar{x}_{ln}$			4,5	3,76	2,3	1,99	1,9	1,7	1,6	1,68	
s_{ln}			1,9	1,56	0,69	0,5	0,5	0,3	0	0,23	

Im Kolostrum schwankten die Rotavirusantikörpertiter zwischen <10 und 1280, der geometrische Mittelwert lag bei 93. Besonders schwach reagierten die Tiere III/315 und III/316, von denen lediglich Tier III/316 am ersten Laktationstag Rotavirusantikörper (Titer: 10) über das Kolostrum ausschied. In der Milch des 7. Laktationstages waren nur bei zwei Tieren Antikörper gegen Rotavirus feststellbar, am 14. Tag bei keinem der neun Tiere, am 21. Tag wiederum bei einem Tier. Die Unterschiede zur Kontrollgruppe I und II waren nicht signifikant.

Im aufgetrennten Kolostrumpool dieser Gruppe (Abb. 7) fanden sich im 1. und 2. Peak Rotavirusantikörper mit einem Titer von 2 bzw. 16. IgG wurde in beiden Peaks nachgewiesen, IgA nur im ersten. Die gepoolten Milchen des 7. Tages wiesen einen Titer von 4 auf, nach der Auftrennung war jedoch keine Aktivität gegen Rotavirus nachweisbar, ebenso wie in den Sammelmilchen des 21. Tages.

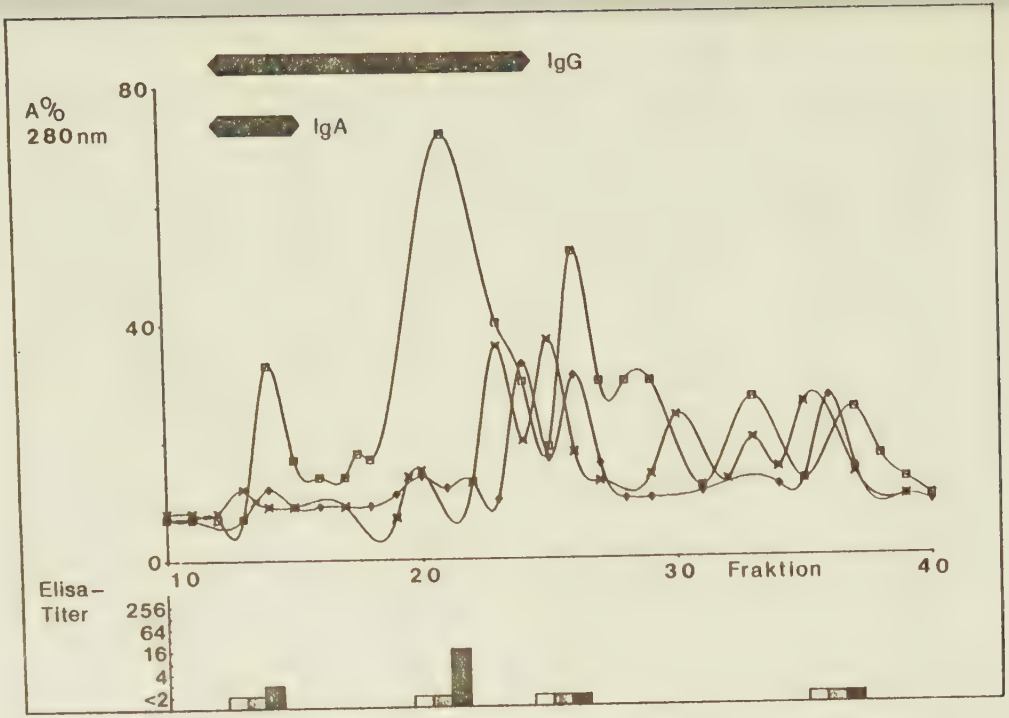

Abbildung 7: Gelchromatographische Auftrennung von Kolostrum und Milch der Tage 7 und 21 von 4 Tieren der Gruppe III. Im oberen Bildabschnitt sind die Immunglobulinklassen durch Balken dargestellt. Die Elisa-Titer der Eluatfraktionen sind in der unteren Bildhälfte durch Säulen dargestellt.

Kolostrum — 7-Tage-Milch — 21-Tage-Milch

Den Tieren der Gruppe IV (n = 7) wurden Adjuvantien und Pind-Avi-Inducer verabreicht. Jedes Tier erhielt pro Applikation 10 ml Pind-Avi zusammen mit 4 ml 2%igem Al-Hydroxid (1:8 verdünnt) und 4 ml PD-Adjuvans.

Die vier untersuchten Serumpaare der Gruppe IV zeigten ähnliche Antikörpertiter wie die der Gruppen I bis III (Tab. 5).

Tab. 5: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 7 Tieren der Gruppe IV (Adjuvans/Inducer)
d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen
n.u. = nicht untersucht

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	2	3	4	5	7	14	21	d
404	n.u.	n.u.	640	10	10	<10	10	10	<10	<10	5
408	n.u.	n.u.	80	10	10	<10	<10	10	<10	<10	10
412	n.u.	n.u.	160	80	10	<10	<10	<10	<10	<10	18
416	40	20	80	40	20	10	<10	<10	<10	<10	14
420	40	40	640	80	10	10	20	10	<10	<10	20
421	160	80	1280	640	10	40	40	20	<10	<10	29
427	20	10	160	40	20	10	<10	<10	<10	<10	14
geometrisches Mittel:			262	48	10	9	9	8,2	5	5	
$\bar{x}_{ln}$			5,6	3,9	2,3	2,2	2,2	2,1	1,6	1,6	
s_{ln}			1,1	1,4	0,56	0,7	0,84	0,52	0	0	

Die Titerwerte im Kolostrum schwankten zwischen 80 und 1280, bei einem Mittelwert von 262. Am 7. Tag lag der Mittelwert in der Milch bei 8,2 und bei drei Tieren waren keine Antikörper mehr nachweisbar. Am 14. und 21. Tag war bei allen Tieren der Antikörpernachweis in der Verdünnung von 1 : 10 negativ. Auch in der Gruppe IV zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrolltieren der Gruppen I und II.

Der Kolostrumpool dieser Gruppe zeigte ein ähnliches Bild der Antikörperverteilung wie der der Gruppe III (Abb. 8). Im 1. und 2. Peak fand sich die größte Aktivität mit einem Titer von 4 bzw. 16. IgA wurde nur im 1. Peak nachgewiesen, IgG in beiden Peaks. Die Sammelmilchproben der Tage 7 und 21 besaßen jeweils einen Titer von 4. Nach der Auftrennung wurden jeweils im 2. Peak Antikörper mit dem Titer von 8 bzw. 4 gefunden. Bei beiden Milchpools konnte ausschließlich IgG nachgewiesen werden.

Bei den Gruppen V bis VIII sollte die Bildung von Milchantikörpern gegen Rotavirus durch verschiedene Viruspräparationen stimuliert werden.

Die 7 Tiere der Gruppe V wurden mit jeweils 15 ml Rotavirussuspension vakziniert.

Tab. 6: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 7 Tieren der Gruppe V (Rotavirus)

d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen
n.u. = nicht untersucht

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	2	3	4	5	7	14	21	d
2	n.u.	n.u.	640	40	40	160	10	20	40	10	29
6	n.u.	n.u.	2560	1280	1280	80	80	80	20	20	9
10	n.u.	n.u.	640	320	40	20	20	10	<10	<10	7
14	20	40	320	20	10	<10	<10	<10	<10	<10	14
25	40	40	320	160	40	10	10	10	<10	<10	21
30	160	40	80	40	20	20	10	<10	<10	<10	18
31	160	40	1280	320	80	20	20	10	<10	<10	14
geometrisches Mittel:			525	131	54	24	16	12	8,2	6,7	
$\bar{x}_{ln}$			6,26	4,9	3,9	3,2	2,8	2,5	2,1	1,9	
s_{ln}			1,1	1,5	1,5	1,2	0,77	0,95	0,86	0,54	

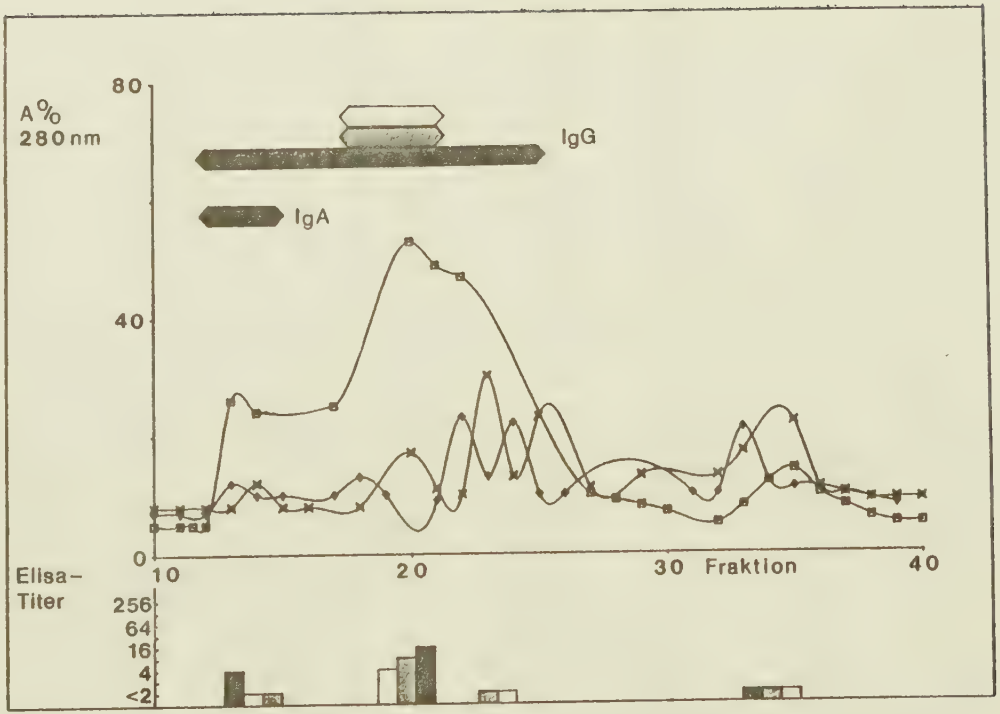

Abbildung 8: Gelchromatographische Auftrennung von Kolostrum und Milch der Tage 7 und 21 von 4 Tieren der Gruppe IV. Im oberen Bildabschnitt sind die Immunglobulinklassen durch Balken dargestellt. Die Elisa-Titer der Eluatfraktionen sind in der unteren Bildhälfte durch Säulen dargestellt.

Kolostrum ⊟—⊟ 7-Tage-Milch ✕—✕ 21-Tage-Milch ◆—◆ □

Vier Serumpaare wurden untersucht. Bei zwei Tieren fiel der Titer von 160 bei der Erstimmunisierung auf 40 zum Zeitpunkt der Geburt, bei einem Tier fiel er um eine Stufe, während er sich beim vierten Tier nicht änderte (Tab. 6).

Der Mittelwert der Kolostrumtiter betrug 525 bei einer Streuung von 80 bis 2560. Am 7. Tag waren in der Milch noch bei fünf Tieren Rotavirusantikörper nachweisbar (geometrisches Mittel 12). Zwei Tiere schieden auch am 14. und 21. Laktationstag noch Antikörper mit der Milch aus. Die Titerwerte dieser Gruppe differierten nicht signifikant von denen der Kontrollgruppen.

Im aufgetrennten Kolostrumpool (Titer 1280) der Gruppe V (Abb. 9) lagen im 2. Peak die höchsten Rotavirusantikörpertiter mit jeweils 128 vor, während die Peaks 1 und 3 nur sehr niedrige Titer von 2 aufwiesen. IgG war in allen drei Peakfraktionen nachweisbar, IgA und IgM jedoch nur im aufsteigenden Schenkel des 2. Peaks.

In dem 7-Tage-Milchpool (Titer 20) fand sich die spezifische Antikörperaktivität mit einem Titer von 8 im 2. Peak und war ausschließlich mit IgG assoziiert. Am 21. Tag betrug der Titer des Pools nur mehr 4. Der 2. und 3. Peak wiesen noch Antikörpertiter von jeweils 2 auf, wobei ebenfalls nur IgG nachgewiesen wurde.

Die Gruppe VI umfaßte drei Tiere, die jeweils 8 ml Rotavirussuspension mit je 4 ml PD-Adjuvans und 2%igem Al-Hydroxid (1:8 verdünnt) erhielten.

Die Serumwerte stiegen beim Tier VI/703 von 80 (20 Tage ante partum) auf 640, beim Tier IV/711 von 20 auf 80, während beim Tier VI/707 der Titer von 80 auf 40 fiel (Tab. 7).

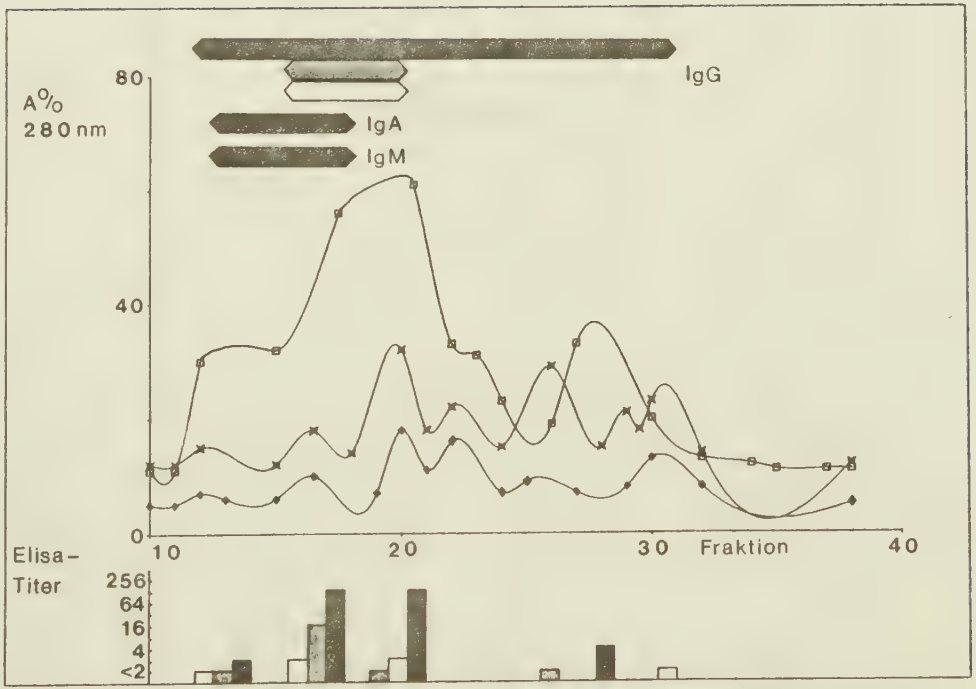

Abbildung 9: Gelchromatographische Auftrennung von Kolostrum und Milch der Tage 7 und 21 von 4 Tieren der Gruppe V. Im oberen Bildabschnitt sind die Immunglobulinklassen durch Balken dargestellt. Die Elisa-Titer der Eluatfraktionen sind durch Säulen in der unteren Bildhälfte dargestellt.

Kolostrum —o—o— ■ 7-Tage-Milch —x—x— ▒ 21-Tage-Milch —◆—◆— □

Tab. 7: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 3 Tieren der Gruppe VI (Rotavirus/Adjuvans)
d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	2	3	4	5	7	14	21	d
703	80	640	1280	1280	320	320	40	10	10	20	20
707	80	40	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	19
711	20	80	320	160	40	20	20	40	40	40	13
geometrisches Mittel:			201	100	40	31,7	15,8	12,6	12,6	15,9	
$\bar{x}_{ln}$			5,3	4,6	3,7	3,45	2,76	2,5	2,5	2,8	
s_{ln}			2,1	2,8	2,0	2,1	1,0	1	1	1	

Tier VI/707 wies auch im Kolostrum nur einen Titer von 20 auf und schied bereits am 2. Laktationstag keine Milchantikörper mehr aus. Durch diesen niedrigen Wert errechnet sich in dieser Gruppe auch ein niedriger geometrischer Mittelwert von 201. Die beiden anderen Tiere wiesen Kolostrumtiter von 320 bzw. 1280 auf.

In der Milch waren bei diesen Tieren bis zum 21. Laktationstag Rotavirusantikörper mit einem Titer von 20 bzw. 40 nachweisbar. Von der Kontrollgruppe I unterschied sich die Gruppe VI nicht signifikant.

Die Kolostrumsammelmilch dieser Gruppe wies einen Titer von 320 auf. Der größte Teil der Antikörper gegen Rotavirus (Titer 32) war im 2. Peak lokalisiert, niedrige Titer fanden sich im ersten Peak (Abb. 10). In zwei Fraktionen des 2. Peaks wurde nur IgA nachgewiesen, in den anderen Fraktionen beider Peaks sowohl IgA als auch IgG.

Nach 7 Tagen waren Antikörper gegen Rotavirus noch in den zwei IgG-Peaks mit Titern von 16 bzw. 32 nachweisbar, während nach 21 Tagen im 2. Peak noch ein Titer von 1 : 16 vorgefunden wurde, der ebenfalls ausschließlich IgG-Aktivität aufwies.

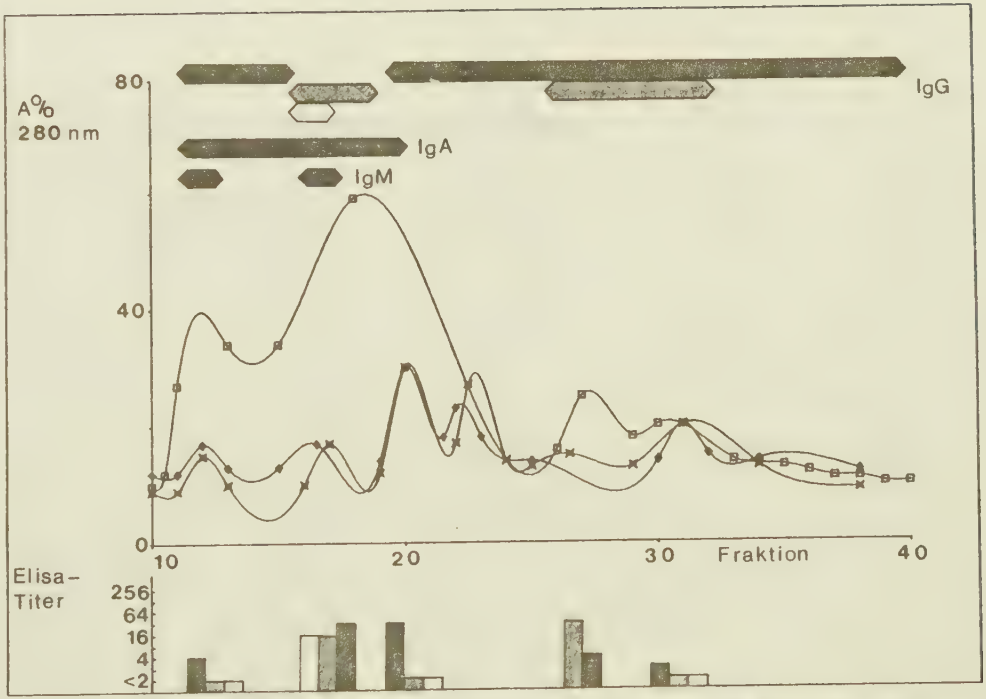

Abbildung 10: Gelchromatographische Auftrennung von Kolostrum und Milch der Tage 7 und 21 von 3 Tieren der Gruppe VI. Im oberen Bildabschnitt sind die Immunglobulinklassen durch Balken dargestellt. Die Elisa-Titer der Eluatfraktionen sind durch Säulen in der unteren Bildhälfte dargestellt.

Kolostrum —o—o— ■ 7-Tage-Milch —x—x— ▨ 21-Tage-Milch —◆—◆— □

Die vier Tiere der Gruppe VII erhielten 10 ml Rotavirussuspension als Liposomenzubereitung.

Bei allen drei untersuchten Serumpaaren zeigte sich ein Abfall der Antikörpertiter von der Erstimmunisierung bis zum Tag der Geburt (Tab. 8).

Im Kolostrum schwankten die Titer von 10 bis 2560, der Mittelwert lag bei 160. 7 Tage später war der Mittelwert der Milchtiter auf 11,9 gesunken. Am 14. Tag schieden noch zwei Tiere Antikörper in der Milch aus, am 21. Tag schließlich noch ein Tier. Die positiven Milchseren besaßen an diesen Tagen jeweils Titer von 10. Zu den Kontrollgruppen I und II gab es keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 8: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 4 Tieren der Gruppe VII (Virus-Liposomenzubereitung)

d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen
n.u. = nicht untersucht

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	7	14	21	d
31	160	80	2560	10	10	10	6
34	80	40	320	20	10	<10	8
37	n.u.	80	10	10	<10	<10	4
43	160	40	80	10	<10	<10	18
geometrisches Mittel:			160	11,9	7	5,9	
$\bar{x}_{ln}$			5,0	2,47	1,95	1,78	
s_{ln}			2,33	0,34	0,4	0,34	

In der Gruppe VIII erhielten 9 Tiere je 10 ml Rotavirussuspension und 8 ml Pind-Avi-Inducer appliziert.

Die Antikörpertiter bei fünf untersuchten Serumpaaren zeigten ein ähnliches Bild wie die in Gruppe V (Tab. 9).

Tab. 9: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 9 Tieren der Gruppe VIII (Rotavirus/Inducer)

d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen
n.u. = nicht untersucht

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	2	3	4	5	7	14	21	d
603	n.u.	n.u.	640	80	20	20	20	20	20	40	2
607	n.u.	n.u.	320	40	20	20	20	20	10	10	7
611	n.u.	n.u.	160	320	320	40	10	<10	<10	<10	13
615	20	20	160	40	20	10	10	<10	<10	<10	14
619	20	20	160	40	20	10	10	10	<10	<10	16
623	160	80	640	1280	40	40	20	20	<10	<10	24
624	40	40	160	40	20	20	10	10	<10	<10	14
628	40	10	320	80	<10	<10	<10	<10	<10	<10	23
633	n.u.	n.u.	640	40	10	20	10	<10	<10	<10	31
geometrisches Mittel:			296	86	23	17	11	9	6,8	6,8	
$\bar{x}_{ln}$			5,7	4,4	3,1	2,8	2,4	2,2	1,9	1,9	
s_{ln}			0,64	1,2	1,1	0,67	0,46	0,64	0,5	0,7	

Im Kolostrum waren die Antikörpertiter auffallend einheitlich: bei einer Streuung der Werte von 160 bis 640 betrug der Mittelwert 296. Nach 7 Tagen fanden sich in der Milch noch bei fünf Tieren Rotavirusantikörpertiter zwischen 10 und 20. Wiederum 7 Tage später ließen sich dieselben Titerwerte noch bei drei Tieren nachweisen, während am 21. Laktationstag jeweils ein Tier einen Titer von 40 und von 10 aufwies.

Bei den restlichen sieben Tieren wurden zu diesem Zeitpunkt keine Milchantikörper gegen Rotavirus mehr festgestellt. Auch bei dieser Gruppe waren Unterschiede zu den Kontrollgruppen nicht signifikant.

Die Verteilung der Antikörper wies ebenfalls Ähnlichkeiten zur Gruppe V auf (Abb. 11). Im Kolostrumpool waren mit 64 die

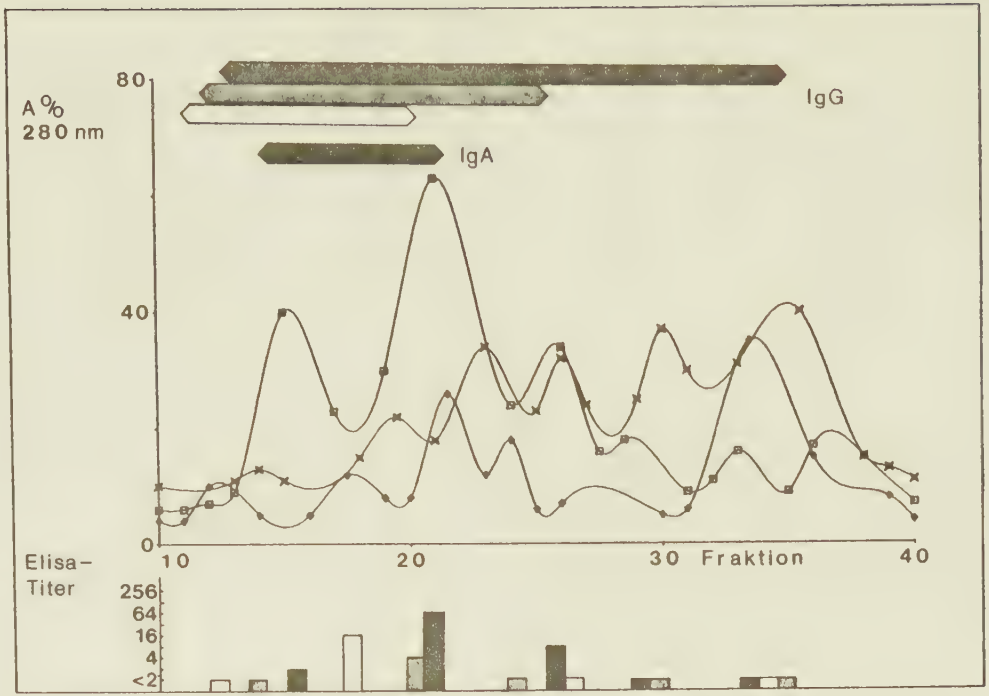

Abbildung 11: Gelchromatographische Auftrennung von Kolostrum und Milch der Tage 7 und 21 von 4 Tieren der Gruppe VIII. Im oberen Bildabschnitt sind die Immunglobulinklassen durch Balken dargestellt. Die Elisa-Titer der Eluatfraktionen sind durch Säulen in der unteren Bildhälfte dargestellt.

Kolostrum —o—o— ▮ 7-Tage-Milch —x—x— ▮ 21-Tage-Milch —•—•— □

höchsten Titer im 2. Peak nachweisbar. IgG-Antikörper wurden in allen Peakfraktionen gefunden, während IgA nur im 1. sowie im aufsteigenden Schenkel des 2. Peaks auftrat. Nach 7 und 21 Laktationstagen waren allerdings noch jeweils im 2. Peak IgG-Antikörper nachweisbar, die einen Titer von 4 bzw. 16 gegen Rotavirus aufwiesen.

Bei den folgenden Gruppen wurde die Wirksamkeit von Rotavirusimmunkomplexen - allein oder mit verschiedenen Adjuvantien - bei der Stimulierung von Antikörpern in Kolostrum und Milch von Rindern untersucht.

In der Gruppe IX (n = 3) wurden jeweils 15 ml Rotavirusimmunkomplexe appliziert.

Bei allen drei Tieren waren die Titer im Serum am Tag der Geburt gegenüber der Erstimmunisierung um eine Verdünnungsstufe angestiegen (Tab.10).

Tab.10: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 3 Tieren der Gruppe IX (Rotavirusimmunkomplexe)
d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	2	3	4	5	7	14	21	d
81	80	160	320	40	20	40	40	20	10	10	13
85	80	160	1280	320	80	80	20	20	10	10	9
89	40	80	640	80	20	10	10	<10	10	<10	13
geometrisches Mittel:			640	100	31,7	68	20	12,5	10	7,9	
$\bar{x}_{ln}$			6,46	4,6	3,45	4,22	2,99	2,53	2,3	2,07	
s_{ln}			0,8	1	0,9	1,1	0,8	0,9	0	0,68	

Im Kolostrum betrug die Titerstreuung 320 bis 1280 und der Mittelwert 640. Am 7. Tag fanden sich bei zwei Tieren in der Milch Antikörper mit einem Titer von 20, beim dritten Tier

(IX/89) war er <10. Am 14. Tag konnten bei allen drei Tieren in der Verdünnung von 1 : 10 Antikörper nachgewiesen werden, während am 21. Tag Tier IX/89 wieder unter der Nachweisgrenze lag. Unterschiede zu den Kontrollgruppen waren aber weder im Kolostrum noch in der Milch signifikant.

Im Kolostrumpool der drei Tiere dieser Gruppe wurde ein Antikörpertiter von 640 gegen Rotavirus festgestellt. Nach Auftrennung lag die Hauptaktivität der Antikörper in den Peaks 1 bis 3 (Abb.12). Die höchsten Titer (256 bzw. 128) wurden im 2. und 3. Peak erreicht. Qualitativ wurde in allen Peakfraktionen IgG nachgewiesen, während IgA in den ersten beiden Peaks vorlag. Der Milchpool des 7. Laktationstages wies noch eine Anti-Rotavirusaktivität von 80 auf. Nach Auftrennung der Globuline wurde im 2. Peak ein Titer von 16 nachgewiesen. Qualitativ fanden sich Antikörper der IgG und der IgA-Klasse. Am 21. Laktationstag wurde im Milchpool noch ein Titer von 16 gemessen. Diese Antikörper waren ausschließlich mit der IgG-Klasse assoziiert.

Im Gegensatz zu den Gruppen I - IX, die nach dem Impfschema I vakziniert wurden, wurde bei der Gruppe X nach Schema II verfahren. Die vier Tiere erhielten jeweils 8 ml Rotavirusimmunkomplexe.

Die Serumtiter von 80 bis 320 (22 bis 25 Tage ante partum) fielen bei allen Tieren um eine bis zwei Titerstufen ab (Tab. 11).

Im Kolostrum wies ein Tier (X/915) einen extrem niedrigen Antikörpertiter von 20 auf, während die Titer der anderen Tiere zwischen 640 und 1280 lagen. Am 7. Tag fanden sich noch bei drei Tieren Rotavirusantikörper in der Milch mit einem Titer von 10. Weitere 7 Tage später konnten noch bei zwei Tieren Antikörper nachgewiesen werden. Für den 21. Tag

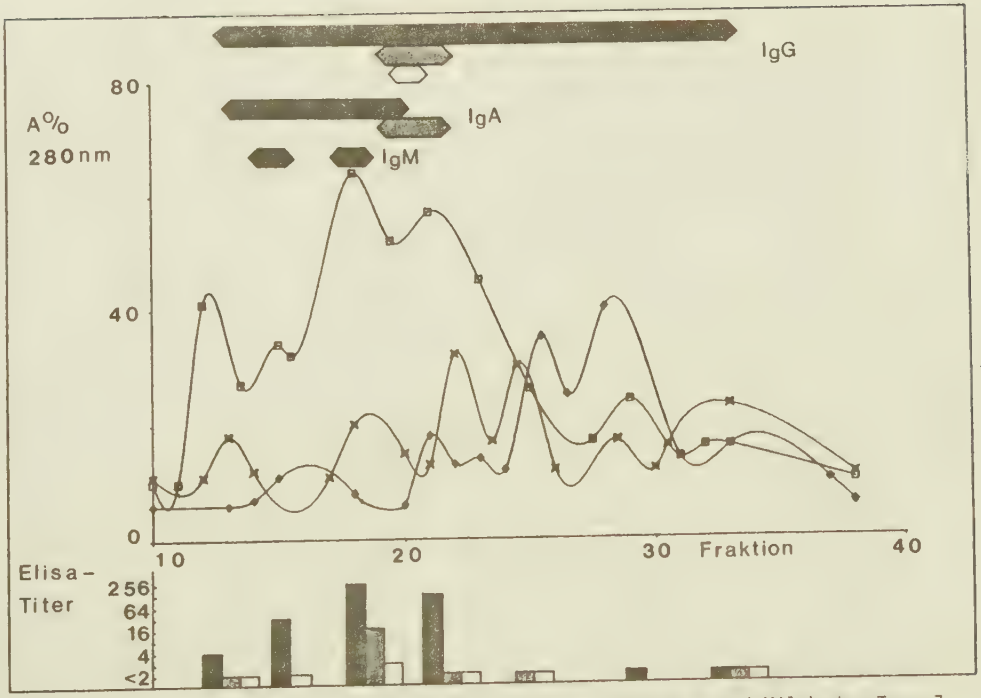

Abbildung 12: Gelchromatographische Auftrennung von Kolostrum und Milch der Tage 7 und 21 von 3 Tieren der Gruppe IX. Im oberen Bildabschnitt sind die Immunglobulinklassen durch Balken dargestellt. Die Elisa-Titer der Eluatfraktionen sind durch Säulen in der unteren Bildhälfte dargestellt.

Kolostrum — 7-Tage-Milch — 21-Tage-Milch

errechnete sich ein geometrischer Mittelwert der Milchtiter von 8,4.

Auch die Werte der Gruppe X unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontrollgruppen I und II.

Tab. 11: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 4 Tieren der Gruppe X (Rotavirusimmunkomplexe)
d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	7	14	21	d
907	80	10	640	10	<10	10	23
915	160	20	20	<10	<10	<10	22
919	320	160	1280	10	10	10	24
927	160	40	1280	10	10	10	25
geometrisches Mittel:			422	7,6	7	8,4	
$\bar{x}_{ln}$			6,0	2	1,9	2,12	
s_{ln}			1,7	0,37	0,4	0,57	

Die sechs Tiere der Gruppe XI wurden wieder nach Impfschema I - Erstimmunisierung 14 Tage vor dem errechneten Geburtstermin - vakziniert. Sie erhielten ebenfalls 8 ml Rotavirusimmunkomplexe, die jedoch mit inaktiviertem Virus hergestellt worden waren.

Die Serumtiter blieben bei zwei Tieren unverändert, während sie bei zwei weiteren Tieren abfielen. Bei den beiden übrigen Tieren wurde ein Antikörperanstieg festgestellt (Tab. 12).

Im Kolostrum erreichten die Antikörpertiter Werte von 80 bis 2560, bei einem geometrischen Mittel von 718. Bis zum 7. Tag fiel der Mittelwert der Milchtiter auf 15,9. Fünf Tiere schieden zu diesem Zeitpunkt noch Rotavirusantikörper aus, wobei Tier XI/15 sogar einen Titer von 160 aufwies. Auch am 14. Laktationstag fanden sich noch bei fünf Tieren Milchantikörper, am 21. Tag noch bei drei Tieren.

Tab. 12: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 6 Tieren der Gruppe XI (Rotavirusimmunkomplexe, inaktiviert)

d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	7	14	21	d
3	40	40	1280	20	<10	<10	14
7	20	80	2560	10	10	<10	31
11	160	80	640	10	10	10	10
15	20	40	640	160	20	<10	12
19	40	40	1280	<10	20	10	18
23	80	40	80	10	10	10	9
geometrisches Mittel:			718	15,9	11,2	7	
$\bar{x}_{ln}$			6,5	2,7	2,4	1,9	
s_{ln}			1,2	1,2	0,5	0,37	

Die Milchantikörpertiter des 14. Tages unterschieden sich signifikant von denen der Kontrollgruppe, die der anderen untersuchten Tage jedoch nicht.

Bei den folgenden Gruppen sollte der Einfluß verschiedener Adjuvantien sowie unterschiedlicher Immunisierungszeitpunkte untersucht werden.

Gruppe XII umfaßte acht Tiere, die 8 ml Rotavirusimmunkomplexe zusammen mit je 4 ml 2%igem Al-Hydroxid (1:8 verdünnt) und PD-Adjuvans nach dem Impfschema I erhielten.

Von den drei untersuchten Serumpaaren zeigte sich bei zweien ein Anstieg um eine bzw. vier Titerstufen, während ein Serumpaar unveränderte Titer aufwies (Tab. 13).

Im Kolostrum eines Tieres wurde nur ein Titer von 80 festgestellt. Sechs weitere wiesen Werte zwischen 320 und 1280 auf (geometrisches Mittel: 579), während eine Kolostrumprobe nicht zur Untersuchung gelangte.

Tab. 13: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 8 Tieren der Gruppe XII (Rotavirusimmunkomplexe/Adjuvantien)

d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen
n.u. = nicht untersucht

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	2	3	4	5	7	14	21	d
1101	n.u.	n.u.	1280	1280	640	640	640	640	640	320	14
1105	n.u.	n.u.	80	20	20	10	10	10	<10	<10	4
1109	n.u.	n.u.	1280	1280	1280	1280	320	160	160	80	9
1113	40	40	320	80	40	40	20	20	10	20	11
1117	10	160	640	320	40	40	20	10	<10	10	15
1118	n.u.	1280	640	640	320	160	320	160	40	40	17
1126	80	160	1280	40	160	80	40	80	20	20	17
1132	n.u.	n.u.	n.u.	80	40	20	20	10	10	<10	31
geometrisches Mittel:			579	190	123	87	67	47	26	23	
$\bar{x}_{ln}$			6,3	5,2	4,8	4,4	4,2	3,8	3,2	3,1	
s_{ln}			1	1,6	1,5	1,7	1,56	1,6	1,7	1,4	

Mit der Milch schieden am 7. Tag alle acht Tiere Rotavirusantikörper aus, wobei das Tier XII/1101 einen Titer von 640 erreichte. Der Durchschnittswert betrug am 7. Tag 47, fiel bis zum 14. Tag auf 26, blieb dann aber bis zum 21. Tag mit 23 relativ konstant. Am 14. und 21. Laktationstag lagen die Antikörpertiter zweier Tiere unter der Nachweisgrenze.

Während sich die Kolostrumtiter dieser Gruppe nicht signifikant von denen der Kontrollgruppen I und II unterschieden, waren die Antikörpertiter in der Milch der Tage 7, 14 und 21 signifikant höher.

Der Antikörpertiter des Kolostrumpools dieser Tiere lag bei 1280. Nach Auftrennung wurde die größte Aktivität im 2. Peak gefunden. Sie war mit IgG und IgA assoziiert und der Antikörpertiter dieses Eluats betrug 256 (Abb. 13). Nach 7 Laktations-

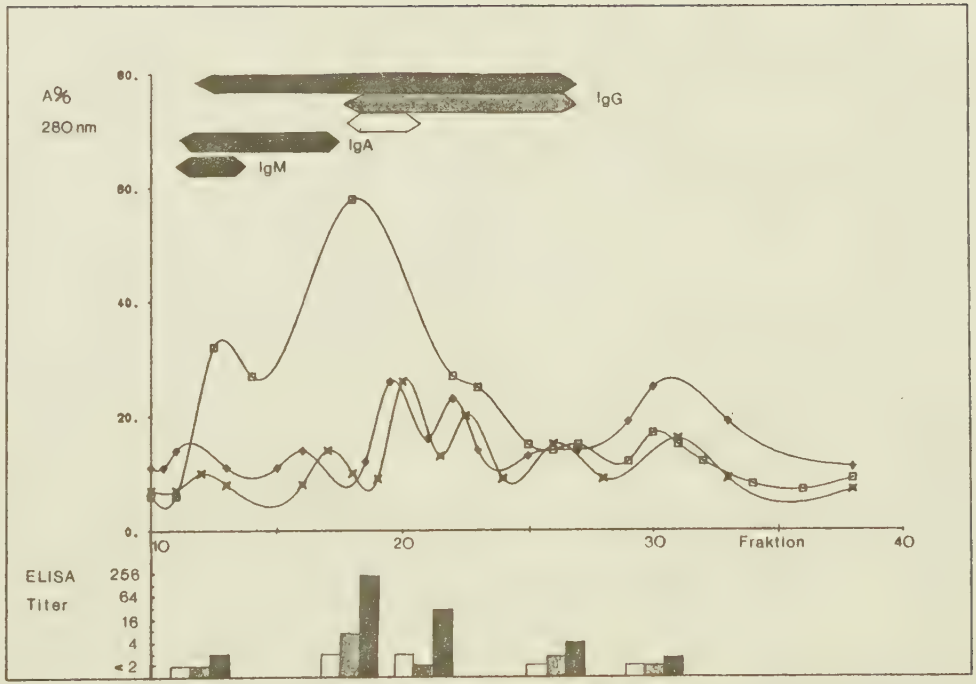

Abbildung 13: Gelchromatographische Auftrennnung von Kolostrum und Milch der Tage 7 und 21 von 4 Tieren der Gruppe XII. Im oberen Bildabschnitt sind die Immunglobulinklassen durch Balken dargestellt. Die Elisa-Titer der Eluatfraktionen sind durch Säulen in der unteren Bildhälfte dargestellt.

Kolostrum —□— ■ 7-Tage-Milch —✕— ▒ 21-Tage-Milch —◆— □

tagen war der Antikörpertiter dieses Milchpools schon auf 40 abgefallen und alle Immunglobuline gehörten zur IgG-Klasse. Am 21. Laktationstag lag dann der Titer des Pools bei 20. Der 2. und 3. Peak dieses Milchpools wies noch jeweils einen Titer von 2 und eine Aktivität ausschließlich in der IgG-Klasse auf.

23 Tiere der Gruppe XIII erhielten 10 ml Rotavirusimmunkomplexe mit 10 ml Adjuvans-PD nach Impfschema I.

Zum Zeitpunkt der Erstimmunisierung konnten im Serum Antikörpertiter von 10 bis 1280 nachgewiesen werden. Bis zum Zeitpunkt der Geburt war der Titer bei zwei Tieren abgefallen und bei fünf Tieren unverändert geblieben. Bei den restlichen Tieren wurde ein Serumtiteranstieg beobachtet, bei Tier XIII/1301 von 160 auf 10240 (Tab. 14).

Die Kolostrumtiter lagen zwischen 20 und 2560 bei einem geometrischen Mittelwert von 459. Bis zum 7. Tag war der Mittelwert in der Milch zwar auf 72 gesunken, aber alle Tiere schieden noch Rotavirusantikörper aus, ebenso am 14. Tag. Selbst am 21. Tag verlief nur bei einem Tier der Antikörpernachweis negativ, während die anderen bei einem Mittelwert von 44 Titer bis 160 aufwiesen.

Auch in dieser Gruppe waren die Werte in der Milch der Tage 7, 14 und 21 signifikant höher als bei den Kontrolltieren und ebenfalls signifikant höher als bei den Tieren der Gruppe IX. Von der Gruppe XII waren die Milchtiter der Gruppe XIII jedoch nicht signifikant verschieden.

Der Kolostrumpool dieser Gruppe wies einen Rotavirusantikörpertiter von 1280 auf. Nach Auftrennung der Globuline wurde im 2. Peak ein Titer von 640 festgestellt (Abb. 14). In diesem Eluat wurde sowohl IgG- als auch IgA-Aktivität nachgewiesen.

Tab. 14: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 23 Tieren der Gruppe XIII (Rotavirus-immunkomplexe/PD-Adjuvans)

d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen
n.u. = nicht untersucht

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	2	3	4	5	7	14	21	d
1301	160	10240	1280	1280	640	640	1280	640	160	160	22
1304	80	640	2500	1280	640	160	320	160	160	160	20
1307	40	n.u.	320	320	320	160	160	320	80	40	40
1309	40	40	160	80	160	40	40	10	80	80	13
1310	10	160	2560	640	80	80	40	20	40	20	18
1317	320	320	80	80	80	80	80	80	40	20	20
1319	160	320	160	320	160	80	160	160	80	40	20
1322	160	640	1280	640	160	160	320	80	80	80	18
1325	160	640	320	160	80	160	160	40	80	80	19
1328	160	80	160	80	40	80	40	20	80	n.u.	17
1349	320	640	1280	1280	1280	640	160	160	40	40	17
1352	80	80	80	20	10	10	10	20	10	10	16
1346	320	n.u.	80	20	40	20	20	20	20	40	18
1302	1280	160	1280	640	640	160	80	320	160	80	16
1305	40	320	1280	1280	320	320	160	160	160	160	15
1308	40	1280	2560	5120	5120	320	160	80	40	80	22
1311	20	320	1280	320	320	320	160	80	40	40	41
1314	80	320	2560	320	80	20	160	80	40	40	23
1320	80	320	1260	160	320	80	80	80	n.u.	40	11
1323	160	160	40	40	40	20	40	40	40	40	13
1326	160	1280	320	320	160	160	80	40	40	n.u.	25
1350	160	160	20	20	20	10	n.u.	20	20	<10	13
1353	n.u.	640	1280	320	160	160	160	80	40	20	15
geometrisches Mittel:			459	251	164	95	102	72	54	44	
$\bar{x}_{ln}$			6,12	5,5	5,1	4,5	4,6	4,28	4	3,7	
s_{ln}			1,5	1,5	1,4	1,2	1	1	0,7	0,9	

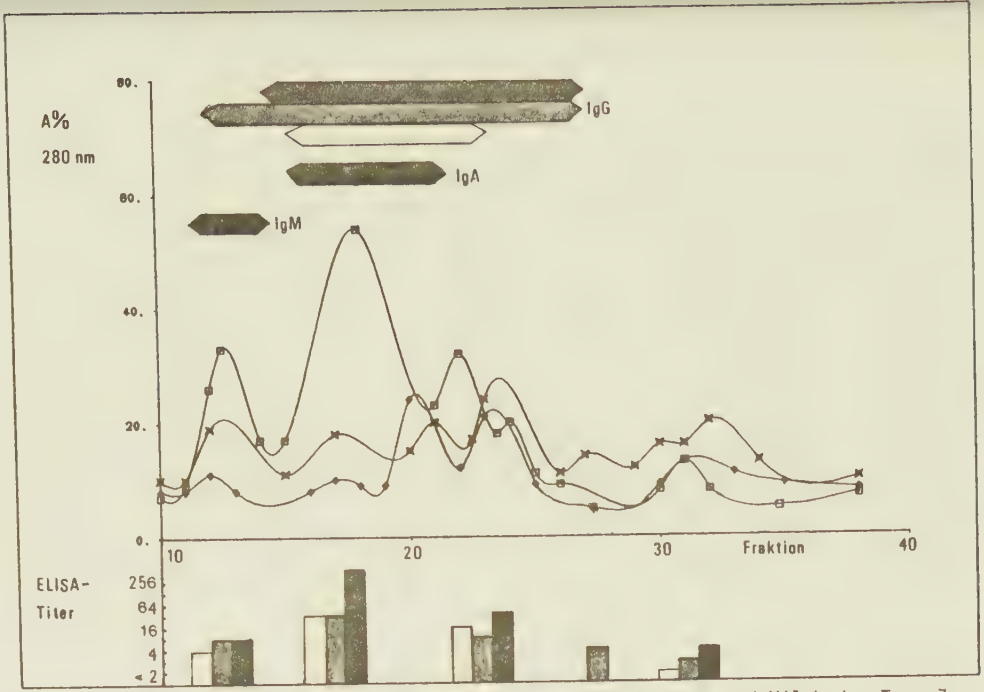

Abbildung 14: Gelchromatographische Auftrennung von Kolostrum und Milch der Tage 7 und 21 von 4 Tieren der Gruppe XIII. Im oberen Bildabschnitt sind die Immunglobulinklassen durch Balken dargestellt. Die Elisa-Titer der Eluatfraktionen sind durch Säulen in der unteren Bildhälfte dargestellt.

Kolostrum ——— 7-Tage-Milch ——— 21-Tage-Milch ———

In der 7-Tage-Sammelmilch lag der Antikörpertiter noch bei 160 und in allen Immunglobulinpeaks wurde ausschließlich IgG nachgewiesen. Nach 21 Laktationstagen wies die Sammelmilch noch einen Titer von 40 auf. Rotavirusantikörper erreichten in den Peaks 1 bis 4 Titer zwischen 4 und 32. Auch hier wurde ausschließlich IgG nachgewiesen.

In Gruppe XIV erhielten sechs Tiere jeweils 8 ml Rotavirusimmunkomplexe mit 2 ml 2%igem Al-Hydroxid (1:8 verdünnt) sowie 1 mg Quil-A nach dem Impfschema II. Zwischen den beiden Vakzinierungen lagen 17 bis 40 Tage, im Durchschnitt 24,2 Tage.

Im Serum lagen bei der Erstimmunisierung die Antikörpertiter zwischen 40 und 160. Bis zur Geburt waren sie bei jeweils einem Tier unverändert bzw. um eine Verdünnungsstufe gesunken, während sie bei vier Tieren um eine bis drei Stufen stiegen (Tab. 15).

Tab. 15: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 6 Tieren der Gruppe XIV (Rotavirusimmunkomplexe/Quil A)

d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	7	14	21	d
1201	80	320	2560	80	40	40	17
1205	40	80	1280	20	20	20	27
1209	160	160	40	40	20	20	17
1213	80	160	1280	20	40	160	23
1217	40	320	20480	160	320	320	21
1221	80	40	640	40	20	<10	40
geometrisches Mittel:			1140	44,9	50	40	
$\bar{x}_{ln}$			7	3,8	3,9	3,7	
s_{ln}			2	0,8	1	1,5	

Im Kolostrum lag das geometrische Mittel der Titerwerte bei 1140, bei einer Streuung von 40 bis 20.480. Am 7. Tag fand sich in der Milch ein Mittelwert von 44,9, am 14. Tag von 50. An beiden Tagen schieden alle Tiere Antikörper mit der Milch aus. Auch am 21. Tag verlief der Antikörpernachweis nur bei einem Tier negativ. Bei einem Mittelwert von 40 wies ein Tier (XIV/1217) noch einen Titer von 320 auf. Die Werte in der Milch der Tage 7, 14 und 21 lagen signifikant über denen der Kontrollgruppen I und II.

Der Kolostrumpool dieser Gruppe wies einen Titer von 2560 auf. Nach Auftrennung fanden sich im 1. Peak Rotavirusantikörper mit einem Titer von 8 (Abb. 15). In diesen Fraktionen wurde sowohl IgA als auch IgG nachgewiesen. Die höchste Aktivität fand sich jedoch im 2. Peak (Titer 512) und war ausschließlich mit IgG assoziiert. In der Sammelmilch des 7. Tages (Titer 80) fanden sich im 2. und 4. Peak Antikörper mit Titern von 16 bzw. 4. Auch hier wurde nur IgG nachgewiesen. Im Milchpool des 21. Tages (Titer 40) wurden im 2. Peak Antikörper mit dem Titer von 16 festgestellt.

Gruppe XV umfaßte ebenfalls sechs Tiere, die 8 ml Rotavirusimmunkomplexe mit inaktiviertem Virus erhielten. Die Adjuvantien waren die gleichen wie in Gruppe XIV. Die Tiere wurden nach Impfschema I innerhalb von 11 bis 20 Tagen ante partum ($\bar{x}$ = 14,7 Tage) immunisiert.

Bei allen Tieren dieser Gruppe kam es im Serum zu einem Anstieg der Titer um bis zu drei Stufen (Tab. 16).

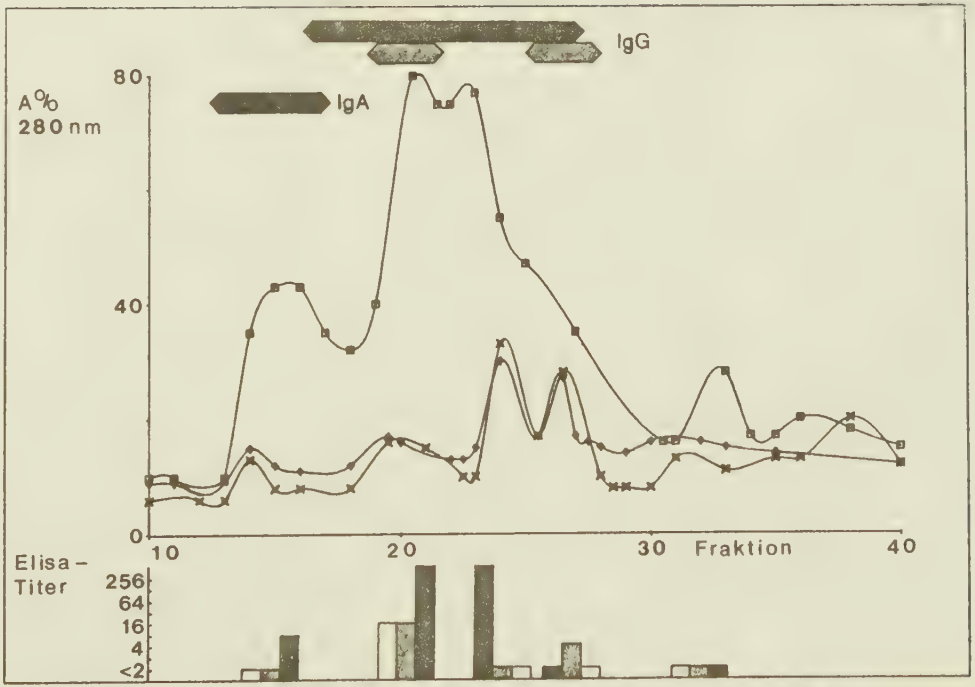

Abbildung 15: Gelchromatographische Auftrennung von Kolostrum und Milch der Tage 7 und 21 von 4 Tieren der Gruppe XIV. Im oberen Bildabschnitt sind die Immunglobulinklassen durch Balken dargestellt. Die Elisa-Titer der Eluatfraktionen sind durch Säulen in der unteren Bildhälfte dargestellt.

Kolostrum —o—o— ▮ 7-Tage-Milch —x—x— ▮ 21-Tage-Milch —◆—◆— □

Tab. 16: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 6 Tieren der Gruppe XV (Immunkomplexe (inaktiviert)/Quil A)

d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	7	14	21	d
1401	40	160	640	20	20	40	12
1405	40	320	1280	40	10	40	20
1409	40	320	1280	20	40	20	14
1413	80	160	1280	10	10	10	16
1417	20	80	1280	160	40	20	11
1421	20	160	2560	80	80	40	15
geometrisches Mittel:			1280	35,6	25	25	
$\bar{x}_{ln}$			7,15	3,6	3,2	3,2	
s_{ln}			0,43	1	0,8	0,56	

Im Kolostrum lagen die Antikörpertiter zwischen 640 und 2560, mit einem geometrischen Mittel von 1280. In der Milch des 7. Tages betrug der Mittelwert 35,6, am 14. und am 21. Tag jeweils 25. Alle Tiere schieden über den gesamten Beobachtungszeitraum Antikörper in der Milch aus. Die Unterschiede zu den Kontrollgruppen waren sowohl im Kolostrum als auch in der Milch der Tage 7, 14 und 21 signifikant.

In der Gruppe XVI wurden fünf Tiere mit je 8 ml Rotavirusimmunkomplexen als Liposomenzubereitung nach Impfschema II immunisiert. Die erste Vakzinierung erfolgte 15 bis 31 Tage vor der Geburt ($\bar{x}$ = 21,4 Tage).

Im Serum zeigte sich bis zur Geburt bei zwei Tieren ein Anstieg, bei zwei weiteren ein Abfall der Antikörpertiter, während ein Tier unveränderte Serumtiter zur Geburt aufwies (Tab. 17).

Tab. 17: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 5 Tieren der Gruppe XVI (Immunkomplexe/ Liposomen)

d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	7	14	21	d
1602	80	320	320	160	40	40	15
1610	20	40	10	<10	<10	<10	28
1614	40	20	40	40	80	10	31
1618	40	20	40	10	20	<10	18
1626	80	80	160	10	10	10	15
geometrisches Mittel:			89,8	17,8	20	10	
$\bar{x}_{ln}$			4,5	2,9	2,99	2,3	
s_{ln}			1,5	1,3	1,27	0,84	

Der Antikörpergehalt im Kolostrum dieser Tiere war auffallend niedrig. Das geometrische Mittel betrug 89,8 bei einer Streuung der Kolostrumtiter von 10 bis 640. Bereits am 7. Tag schied ein Tier keine Antikörper mehr mit der Milch aus, der Mittelwert sank auf 17,8. Am 21. Tag fanden sich nur mehr bei drei Tieren Rotavirusantikörper in der Milch mit einem Mittelwert von 10. Nur die Werte des 14. Laktationstages (geometrisches Mittel 20) lagen signifikant über denen der Kontrolltiere.

Im Kolostrumpool dieser Gruppe (Titer 320) fand sich nach Auftrennung die höchste Aktivität im 2. Peak (Titer 256). In diesen Fraktionen wurde sowohl IgA als auch IgG nachgewiesen. Im 3. Peak (Titer 8) wurde nur IgG festgestellt. In der Sammelmilch des 7. Tages (Titer 10) wurde im 2. Peak ein Antikörpertiter von 8 festgestellt. Der Milchpool des 21. Tages wies einen Titer von 4 auf. Nach Auftrennung fanden sich im 2. und 3. Peak Antikörper mit einem Titer von 2 (Abb 16).

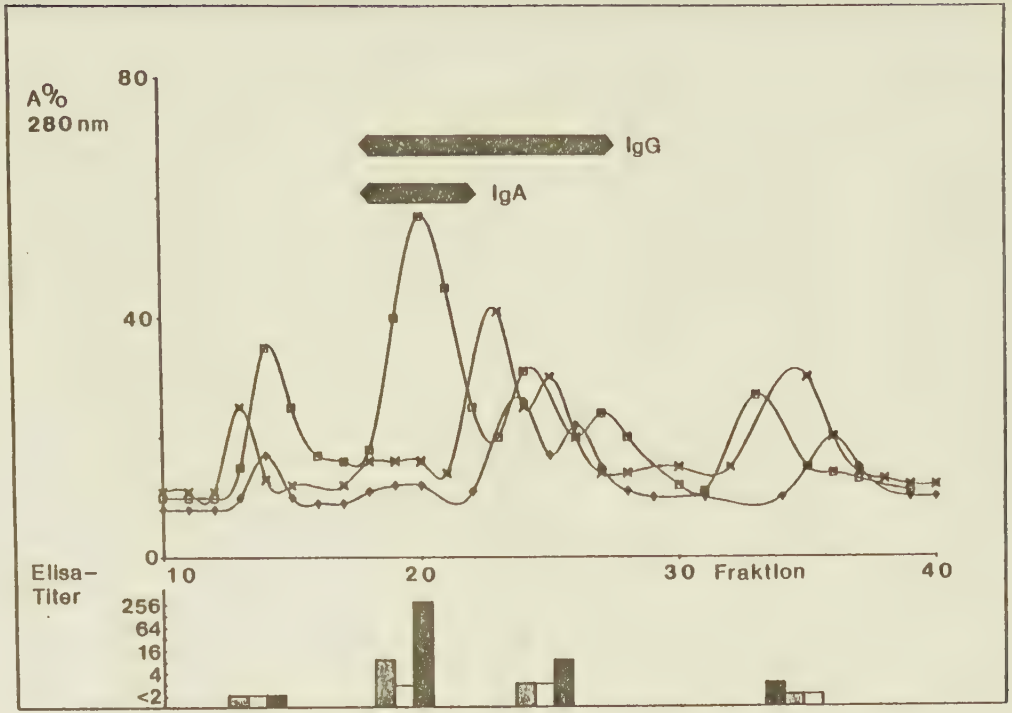

Abbildung 16: Gelchromatographische Auftrennung von Kolostrum und Milch der Tage 7 und 21 von 4 Tieren der Gruppe XVI. im oberen Bildabschnitt sind die Immunglobulinklassen durch Balken dargestellt. Die Elisa-Titer der Eluatfraktionen sind in der unteren Bildhälfte durch Säulen dargestellt.

Kolostrum 7-Tage-Milch 21-Tage-Milch

Schließlich wurden sechs Tiere in Gruppe XVII mit 8 ml Rotavirusimmunkomplexen aus inaktiviertem Virus als Liposomenzubereitung nach Impfschema I vakziniert. Die Erstimmunisierung erfolgte 10 - 21 Tage ante partum (Mittelwert: 14,8 Tage).

Bei zwei Tieren zeigte sich im Serum ein Anstieg der Titer, bei einem ein Absinken, drei Tiere wiesen unveränderte Titer auf (Tab. 18).

Tab. 18: Antikörpertiter in Serum, Kolostrum und Milch von 6 Tieren der Gruppe XVII (Immunkomplexe (inaktiviert)/Liposomen)

d = Zeitraum in Tagen zwischen den Immunisierungen

Tier-Nr.:	Serum 1	Serum 2	Milchantikörpertiter an den Laktationstagen 1	7	14	21	d
2	80	80	640	10	10	10	15
6	80	80	640	80	20	40	10
10	80	40	640	20	10	<10	15
14	160	160	2560	80	20	20	14
18	40	80	320	10	10	10	14
22	10	20	320	40	10	40	21
geometrisches Mittel:			403	28,3	11,2	12,6	
$\bar{x}_{ln}$			5,99	3,3	2,4	2,5	
s_{ln}			1,6	0,9	0,5	1,0	

Im Kolostrum erreichten die Rotavirusantikörper Titer von 320 bis 2560 (Mittelwert 403). Mit der Milch des 7. Tages schieden alle Tiere Antikörper aus. Der Mittelwert der Titer war jedoch auf 28,3 gesunken. Am 14. Tag fanden sich bei 5 Tieren Antikörper gegen Rotavirus, der Mittelwert betrug jetzt 12,6. Die Werte des 7., 14. und 21. Tages lagen signifikant über denen der Kontrollgruppen I und II.

Abbildung 17 zeigt Verlauf der geometrischen Mittelwerte der Milchantikörpertiter der Gruppen XIV bis XVII.

Die Impfstoffe, die aus vermehrungsfähigen Erregern hergestellt wurden, unterschieden sich bei Verwendung der gleichen Adjuvantien nicht signifikant von Vakzinen aus inaktiviertem Virusmaterial.

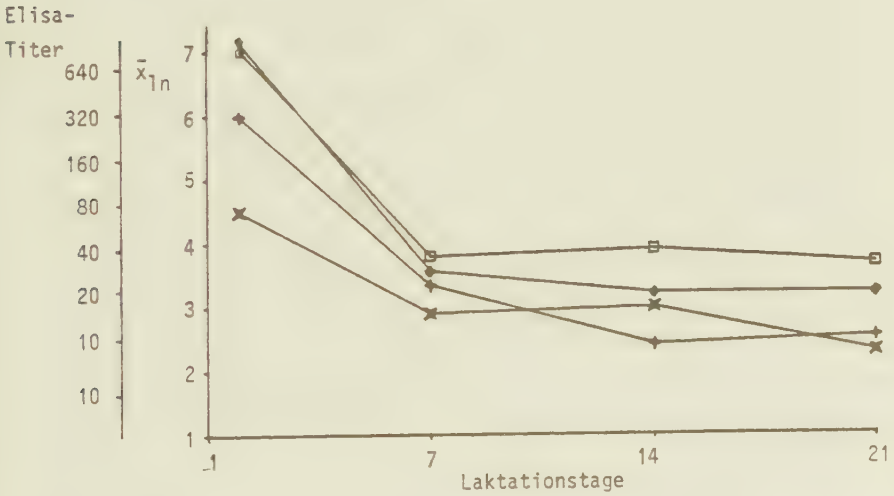

Abbildung 17: Vergleich der Rotavirusantikörpertiter (geometrische Mittelwerte) in Kolostrum und Milch frischlaktierender, parenteral immunisierter Kühe.

Gruppe XIV —□—□— Gruppe XV —×—×—

Gruppe XVI —♦—♦— Gruppe XVII —+—+—

4. Besprechung der Ergebnisse

Es ist bekannt, daß die meisten der bisher untersuchten Tierspezies Antikörper gegen Rotavirus über das Kolostrum ausscheiden (WOODE et al., 1975; ELLENS et al., 1978; WELLS et al., 1978; HESS und BACHMANN, 1981). Die Dauer und das Ausmaß dieser Antikörpersekretion während der frühen Laktationsphase nach der Geburt ist von der Tierart abhängig. Generell ist mit dem rapiden Abfall der IgG bei allen bisher untersuchten Tierarten auch ein starkes Absinken der Rotavirusantikörper in der Milch verbunden.

Beim Schwein wird dieses starke Absinken der Antikörpersekretion jedoch nur bis zum 2.-3. Tag nach der Geburt beobachtet. Von diesem Zeitpunkt an stellt lokal synthetisiertes IgA den Hauptanteil der Immunglobuline im Milchsekret dieser Tierart dar und der IgA-Anteil steigt bis zum Ende der Säugeperiode auf 80-90% der Gesamtimmunglobuline (CURTIS und BOURNE, 1971). Deshalb ist der Abfall der Milchantikörper gegen Rotavirus bei Schweinen weniger stark ausgeprägt. Bei einem Großteil der Tiere kommt es zu keinem Abfall der spezifischen Antikörpertiter nach natürlicher Infektion (HESS und BACHMANN, 1981).

Beim Wiederkäuer wird dagegen ein physiologisch bedingtes kontinuierliches Absinken der absoluten Milchimmunglobulinwerte (PORTER, 1972) sowie der Rotavirus-spezifischen Antikörper (SNODGRASS und WELLS, 1978; ACRES und BABIUK, 1978) beobachtet. In dieser Tatsache ist die Ursache für die großen wirtschaftlichen Probleme zu sehen, die die Rotavirusinfektion weltweit für die Rinderaufzuchtbetriebe darstellt.

Feldversuche über die Stimulierung der laktogenen Immunität gegen Rotavirus sind beim Rind bisher nicht durchgeführt worden.

In der Bundesrepublik Deutschland wurden bisher lediglich Untersuchungen über den Durchseuchungsgrad der Rinderpopulation mit Rotavirus vorgenommen. Nach der Feststellung der Erkrankung in Deutschland durch DIRKSEN und BACHMANN (1977) wies BRUNNER (1978) im bayerischen Raum bei 98,5% aller Rinder neutralisierende Rotavirus-Antikörper nach. SCHUHMACHER (1980) fand, daß im norddeutschen Raum 97,15% der 285 untersuchten Tiere im Rotavirus-Antikörper-Elisa bei einer Serumverdünnung von 1 : 10 und höher positiv reagierten. Diese Befunde werden durch Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Von 101 untersuchten Seren, die bei der Erstimmunisierung gewonnen wurden, wiesen alle einen Rotavirus-Antikörpertiter von 10 oder höher auf. Eine Immunisierung von unter Feldbedingungen gehaltenen Rindern kommt also immer einer "Reimmunisierung" eines sensibilisierten Tieres gleich, wobei der erste Kontakt mit dem Antigen über den Darmtrakt erfolgt ist. Dieser enterale Erstkontakt scheint bei Rotavirus und anderen enterotropen Viren für die Bildung von spezifischen Antikörpern im Serum und Milchdrüsensekret besonders wichtig zu sein. So konnte in Vorversuchen zu dieser Arbeit bei Rotavirus-Antikörper-freien Mäusen nach zweimaliger s.c. Injektion von Rotavirus zusammen mit Al-Hydroxid keine Antikörperbildung beobachtet werden. Bei natürlich infizierten Tieren kann dagegen durch parenterale Immunisierung ein Boostereffekt ausgelöst werden, wobei es scheint, daß zusätzlich zu geeigneten Antigenpräparationen Adjuvantien absolut notwendig sind.

Die Milchantikörpertiter der Gruppe V, die Rotavirus ohne Adjuvans erhalten hatten, lagen nicht signifikant über denen der Kontrollgruppe. Auch BACHMANN und HESS (unveröffentlichte Ergebnisse, 1979) konnten eine verlängerte Ausscheidung von Rotavirusantikörpern in der Milch durch s.c. Applikation von Rotavirus allein nicht stimulieren. Dagegen konnte die Arbeitsgruppe von SNODGRASS et al. (1980) mit 2 ml einer inaktivierten Rotavirusvakzine, die inkomplettes Freund'sches

Adjuvans enthielt, über einen Zeitraum von 28 Tagen post partum hohe Rotavirusantikörpertiter in der Milch induzieren. In den Kolostren geimpfter Tiere fanden die Autoren neutralisierende Antikörper mit einem Titer von 20.000, bei Kontrolltieren jedoch nur Titer von 80 - 160. WOODE et al. (1975) wiesen dagegen bei natürlich infizierten Rindern im Kolostrum Titer von 160 bis 2560 nach.

ELLENS et al. (1978) verglichen Neutralisationstest und Rotavirusantikörper-Elisa. Sie fanden im Kolostrum nicht immunisierter Rinder Titer zwischen <100 und 6400 mit einer hohen Korrelation der Ergebnisse dieser Nachweismethoden. SCHUHMACHER (1980) fand in den Kolostren natürlich infizierter Tiere im Elisa Titer von <10 bis 2560. Diese Ergebnisse werden in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

Die großen Differenzen zwischen den Ergebnissen von SNODGRASS et al. (1980) und denen dieser Arbeit lassen sich nicht einfach erklären. Neben den unterschiedlichen Verfahren des Antikörpernachweises (N-Test und Elisa) können jedoch folgende Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein: die Immunisierungszeitpunkte in den beiden Arbeiten sind völlig verschieden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere 14 Tage vor dem errechneten Geburtstermin erstimmunisiert und am Tag der Geburt geboostert, während SNODGRASS et al. (1980) zum ersten Mal beim Decken impfte und die Vakzinierung sieben Monate später wiederholten. Der Einfluß derart unterschiedlicher Immunisierungszeitpunkte auf die Bildung von Milchantikörpern wurde beim Rind bisher nicht untersucht. In der Praxis erscheint aber eine Erstimmunisierung zum Deckzeitpunkt nicht anwendbar.

Zudem machen die Autoren leider keinerlei Angaben über die Milchleistung ihrer Tiere. Es ist vorstellbar, daß bei Tieren mit sehr niedrigen Leistungen höhere Antikörpertiter als bei Tieren mit durchschnittlicher oder hoher Milchleistung vorkommen.

Die größten Unterschiede liegen jedoch in den verwendeten Adjuvantien.

SNODGRASS et al. (1980) benützten inkomplettes Freund'sches Adjuvans. Dieses mineralölhaltige Produkt besitzt zwar hervorragende Adjuvans-Eigenschaften, kann jedoch zu erheblichen lokalen Reaktionen an der Injektionsstelle führen (EDELMANN, 1980). Seiner Anwendung sind daher enge Grenzen gesetzt und in einem Feldversuch ist es nicht einsetzbar. Die in dieser Arbeit verwendeten Adjuvantien wurden hauptsächlich nach dem Kriterium der Unschädlichkeit ausgewählt. Bei keinem der Tiere, die Adjuvans-haltige Präparationen erhielten, traten lokale oder systemische Reaktionen auf. Auch wurde keine erhöhte Rate von Totgeburten festgestellt.

Während bei den vakzinierten Tieren die Erhöhung der Antikörpertiter gegenüber nichtimmunisierten Kontrolltieren unwesentlich war, konnte mit einigen Vakzinen die Ausscheidung von Milchantikörpern deutlich verlängert werden. Sehr gute Ergebnisse erbrachte die Verwendung von Rotavirusimmunkomplexen zusammen mit Adjuvans-PD bzw. mit Aluminiumhydroxid und dem Saponinderivat Quil A. Ähnlich wirksam war eine Kombination der Adjuvantien Aluminiumhydroxid und PD-Adjuvans mit Immunkomplexen.

Dabei spielte es keine Rolle, ob das für die Komplexierung verwendete Antigen inaktiviert oder vermehrungsfähig war.

Dagegen konnten Adjuvantien allein eine Ausscheidung von Antikörpern in der Milch nicht stimulieren. Auch Liposomenpräparationen erbrachten schlechte Ergebnisse, gleichgültig ob sie mit Immunkomplexen oder mit unkomplexiertem Virus hergestellt wurden.

Liposomen können mit unterschiedlichen Methoden hergestellt werden und dienen neben der Aufklärung der Biochemie von

viralen Hüllkomponenten (HELENIUS et al., 1977) zur Erhöhung der Immunogenität von Virus-Spaltvakzinen (KRAMP et al., 1979) und Toxoidpräparationen (EDELMANN, 1980). SANCHEZ et al. (1980) verglichen die Adjuvanswirkung von Aluminiumgel ($AlK(SO_4)_2 \times 12\ H_2O$) bei intakten Hepatitis B-Virus-Oberflächenantigenen (HB_sAg) und gereinigten Untereinheiten mit den jeweiligen Liposomenpräparationen. Bei der aus den Polypeptid-Untereinheiten hergestellten Vakzinen zeigte sich die Liposomenzubereitung überlegen, bei Verwendung intakter Partikel jedoch das Aluminiumgel. Möglicherweise erreicht man eine erhöhte Immunogenität von Liposomenpräparationen im Vergleich zu anderen Adjuvantien generell nur dann, wenn Virusuntereinheiten verwendet werden.

Über die relativ schlechte Immunogenität von Liposomenpräparationen mit Immunkomplexen in dieser Arbeit kann nur spekuliert werden, da vergleichbare Untersuchungen nicht vorliegen. Möglicherweise werden die Immunkomplexe durch die Ultraschallbehandlung der Liposomenpräparation zerstört (NOTKINS, 1971).

Bei dem Präparat Pind-Avi-Inducer wurde untersucht, ob es beim Rind zusätzlich zu seiner paramunitätssteigernden Wirkung einen Adjuvanseffekt besitzt. Die Induktion einer Paramunität bei verschiedenen Tierarten ist dokumentiert (MAYR und BRUNNER, 1980). Ein zusätzlicher Adjuvanseffekt des Inducers ist dagegen nicht beschrieben. In der vorliegenden Untersuchung führte Pind-Avi weder in Kombination mit Rotavirus noch mit Al-Hydroxid und PD-Adjuvans zu einer signifikanten Stimulierung der Antikörperausscheidung.

Angeregt durch Arbeiten von HOUSTON et al. (1974) wurde eine Stimulierung der laktogenen Immunität des Rindes durch Immunkomplexe versucht.

Die meisten Autoren, die über die immunogene Wirkung von Antigen-Antikörperkomplexen arbeiteten, erzielten die besten

Ergebnisse mit Immunkomplexen, in denen Antigen und Antikörper etwa im Gleichgewicht vorlagen. Zur Bestimmung des Äquivalenzbereichs wurde in der Regel die Technik der quantitativen Präzipitation mit radioaktiv markiertem Antigen oder Antikörper verwendet. Bei dieser Methode verändert sich ein einmal eingestelltes Gleichgewicht zwischen Immunkomplexen einerseits und freiem Antigen bzw. Antikörper kaum.

Die in dieser Arbeit verwendeten Immunkomplexe wiesen im Rotavirusantikörper-Elisa einen Titer von 32 auf, während der Antigennachweis im Elisa negativ war. Trotz dieses hohen Antikörpertiters dürften die Immunkomplexe aber tatsächlich näher am Äquivalenzbereich liegen.

Benützt man nämlich zur Bestimmung des Antigen-Antikörperverhältnisses im Komplex den Elisa, so liegen völlig andere Verhältnisse als bei der Präzipitationsmethode vor:
Beim Antigennachweis wird wahrscheinlich die Bindung des im Komplex vorhandenen Antigens an die als Festphase gebundenen Antikörper durch die im Komplex vorliegenden Antikörper sterisch behindert.

Beim Antikörpernachweis kommt es dagegen durch Bindung freier Antikörper an das als Festphase vorliegende Antigen zu einer Änderung des Gleichgewichtes zwischen Komplexen und freien Antikörpern. Dadurch tritt eine Umbildung der Komplexe ein, wobei zusätzliche Antikörper frei werden können und somit die tatsächliche freie Antikörpermenge überschätzt wird.

Das Verhältnis von Antigen zu Antikörper könnte durch Methoden, mit denen sich Immunkomplexe direkt nachweisen lassen, genauer bestimmt werden. Die bisher bekannten Methoden sind aber zu aufwendig. Eine genauere Definition der Komplexe wäre jedoch im Hinblick auf eine Standardisierung der Impfstoffe wünschenswert.

Die höhere Wirksamkeit von Immunkomplexen im Vergleich zu freiem Antigen in der Stimulierung einer Booster-Reaktion gegen Rotavirus im Milchsekret von Rindern deckt sich nicht mit den Ergebnissen von STONER und TERRES (1963). Diese Autoren erzielten bei Verwendung von Immunkomplexen eine schwächere Sekundärantwort als mit freiem Antigen. Da ihre Versuche jedoch mit Mäusen durchgeführt und sowohl ein anderes Antigen als auch ein anderes Immunisierungsschema benützt wurden, können beide Ergebnisse nur bedingt verglichen werden. Dagegen zeigten in vitro-Versuche von CARVALHO et al. (1980), daß Immunkomplexe nur bei Antigen-sensibilisierten Lymphozyten eine Antigen-spezifische Blastogenese hervorrufen.

Die guten Ergebnisse, die in dieser Arbeit mit Immunkomplexen kombiniert mit Adjuvantien erzielt wurden, stellen eine Bestätigung dieser in vitro-Versuche dar. Offenbar ist aber die zusätzliche Applikation von Adjuvantien eine Voraussetzung für den erzielten Immunisierungserfolg.

Aufgabe weiterer Untersuchungen wird es unter anderem sein, zu prüfen, ob diese durch parenterale Immunisierung stimulierten Milchantikörper Kälber vor Rotavirusinfektionen schützen können.

5. Zusammenfassung

119 Kühe und Färsen wurden in 17 Gruppen eingeteilt und mit verschiedenen Rotavirus-Vakzinen je zweimal parenteral immunisiert, um die Ausscheidung von Rotavirusantikörpern in der Milch frischlaktierender Rinder zu verlängern.

Alle in den Versuchen verwendeten Tiere wiesen vor Versuchsbeginn im Serum Antikörper gegen Rotavirus auf.

Durch keine der verwendeten Vakzinen wurde der Antikörpertiter im Kolostrum entscheidend beeinflußt. Dagegen konnte durch Immunisierung mit Rotavirusimmunkomplexen und Adjuvantien (Aluminiumhydroxid, Adjuvans-PD oder Quil A) die Antikörperausscheidung in der Milch signifikant verlängert werden. Am 21. Laktationstag fanden sich bei diesen Gruppen noch spezifische Antikörpertiter zwischen 23 und 44 im Vergleich zu 5,3 bei den Kontrollgruppen (geometrische Mittelwerte). Dabei war es gleichgültig, ob das zur Herstellung der Immunkomplexe verwendete Virus inaktiviert war oder nicht.

Vakzinen aus nicht komplexiertem Rotavirus konnten hingegen die Ausscheidung von Antikörpern in der Milch ebensowenig verlängern wie die alleinige Verabreichung von Adjuvantien. Auch Liposomenpräparationen zeigten keinen Effekt.

Im Kolostrum wurden bei allen Tieren spezifische Antikörper der Klassen IgA und IgG festgestellt. Am 7. Laktationstag wurde IgA nur mehr bei den Kühen nachgewiesen, die Rotavirusimmunkomplexe erhalten hatten. Am 21. Laktationstag fand sich bei allen geimpften Gruppen nur mehr IgG.

Summary

Prolongation of milk antibody secretion against bovine rotavirus by means of parenteral vaccination

119 cows and heifers in 17 groups were parenterally vaccinated twice with different rotavirus vaccines, in order to increase and prolong secretion of rotavirus antibodies in the milk of the first three weeks of lactation.

All animals used in these experiments had rotavirus anti-antibody titres in the serum before the study was started. Colostral antibody titres were not influenced markedly by any of the vaccines employed.
However, secretion of antibodies in milk could be significantly increased and prolonged after immunization with antigen-antibody complexes and adjuvants (Aluminium hydroxide, adjuvant-PD or quil A). Specific antibody titres between 23 and 44 (geometric mean values) were detected at day 21 of lactation, compared to 5.3 in control groups. It made no difference, whether the virus used for the production of immune complexes was inactivated or not.

An increase or prolongation of antibody secretion in milk was neither observed after application of rotavirus or antigen-antibody complexes nor adjuvant only. In addition, liposomes showed no effect.

Specific antibodies in colostrum were associated with the classes IgA and IgG in all animals. At day 7 of lactation IgA was only demonstrated in cows which were given rotavirus antigen-antibody complexes. At day 21 of lactation only IgG was detected in the milk of all vaccinated animals.

6. Literaturverzeichnis

ACRES, S.D., L.A. BABIUK, 1978: Studies on rotaviral antibody in bovine serum lacteal secretions using radioimmunoassay.
J.Amer.vet.med.Ass. 173: 555-559.

ANONYM, 1976: Biomathematik für Mediziner.
Hrsg.: KOLLEGIUM BIOMATHEMATIK, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin

ANONYM, 1977: The role of immune complexes in disease.
WHO Techn.Rep.Ser. No. 607, 1-58.

AREND, W.P., M. MANNIK, 1971: Studies on antigen-antibody complexes. II Quantification of tissue uptake of soluble complexes in normal and complement-depleted rabbits.
J.Immunol. 107, 63-75.

AREND, W.P., M. MANNIK, 1972: In vitro adherence of soluble immune complexes to macrophages.
J.exp.Med. 136, 514-531.

AVRAMEAS, S., T. TERYNCK, 1971: Peroxidase labelled antibody and fab conjugates with enhanced intracellular penetration.
Immunochemistry 8, 1175-1179.

BACHMANN, P.A., 1979: Rotavirus in Faezes: Erfahrungen mit dem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).
Zbl.Vet.Med.B, 26, 835-842.

BACHMANN, P.A., R.G. HESS, 1981: Routine isolation and cultivation of bovine rotaviruses in cell culture.
Amer.J.vet.Res., (im Druck)

BACHMANN, P.A., R.G. HESS, T. HÄNICHEN, 1979: Isolierung und Identifizierung von Rotaviren als Durchfallerreger bei Ferkeln und deren Verbreitung beim Schwein in der Bundesrepublik Deutschland.
Tierärztl. Umschau 34, 825-828.

BERMAN, M.A., W.O. WEIGLE, 1977: B-lymphocyte activation by the Fc fragment of IgG.
J.exp.Med. 146, 241-256.

BERMAN, M.A., H.L. SPIEGELBERG, W.O. WEIGLE, 1979: Lymphocyte stimulation with Fc fragments.
I. Class, subclass and domain of active fragments.
J.Immunol. 122, 89-95.

BERRY, D.M., J.D. ALMEIDA, 1968: The morphological and biological effects of various antisera on avian bronchitis virus.
J.gen.Virol. 3, 97-102.

BRANDON, M.R., D.L. WATSON, A.K. LASCELLES, 1971: The concentrations of immunoglobulins in the blood serum and whey of dairy cows.
Aust.J.Dairy Technol. 26, 143.

BRUNNER, R., 1978: Serologische Untersuchungen über das Vorkommen von Rotavirusinfektionen beim Rind in Bayern.
Vet.Med.Diss., München

BUTLER, J.E., 1971: A review of the bovine immunoglobulins.
J.Dairy Sci. 54, 1315-1316.

CAMBELL, B., W.E. PETERSEN, 1963: Immune milk. A historical Survey.
Dairy Sci.Abstr. 25, 345.

CARVALHO, E.M., J.S. DAVIS, D.A. HORWITZ, 1980: Conditions required for Fc-dependent immune complex enhancement of antigen-specific lymphocyte blastogenesis.
J.Immunol. 124, 565-570.

CARVALHO, E.M., D.A. HORWITZ, 1980: Characterization of a non-T, non-B human blood lymphocyte that mediates the enhancing effects of immune complexes on lymphocyte blastogenesis.
J.Immunol. 124, 1656-1661.

CHANG, C.C., A.J. WINTER, N.L. NORCROSS, 1980: Antibody-producing cells in bovine lacteal secretions after local immunization.
Amer.J.Vet.Res. 41, 1416-1418.

DALSGAARD, K., 1978: A study of the isolation and characterization of the saponin Quil A.
Acta.vet.scand.19, Suppl. 69, 1-40.

DIRKSEN, G., P.A. BACHMANN, 1977: Zum Vorkommen von Rota- und Coronavirus als Ursache von Kälberdiarrhoe in der Bundesrepublik Deutschland.
Berl.Münchn.Tierärztl. Wschr. 90, 475-477.

DENNERT, G., 1971: The mechanism of antibody-induced stimulation and inhibition of the immune response.
J.Immunol. 106, 951-955.

DERBYSHIRE, J.B., B.I. HELLIWELL, 1962: Immunity to experimental staphylococcal mastitis in goats produced by alpha lysin, coagulase and leucocidin.
Res.vet.Sci. 3, 56-62.

DICKLER, H.B., 1976: Lymphocyte receptors for immunoglobulin.
Adv.Immunol. 24, 167-214.

DIXON, F.J., W.O. WEIGLE, J.J. VAZQUEZ, 1961: Metabolism and mammary secretion of serum proteins in the cow.
Lab.Invest. 10, 216.

EDELMANN, R., 1980: Vaccine adjuvants.
Inf.Dis.Rev., 2, 370-383.

ELLENS, D.J., P.W. De LEEUW, P.J. STRAVER, 1978: The detection of rotavirus specific antibody in colostrum and milk by Elisa.
Ann.Rech.Vet. 9, 337-342.

ELLNER, J.J., P.E. LIPSKY, A.S. ROSENTHAL, 1977: Antigen handling by guinea pig macrophages: further evidence for the sequestration of antigen relevant for activation of primed T lymphocytes.
J.Immunol. 118, 2053-2057.

GOUDSWAARD, J., R.H. VAN DAM, J.A. VAN DER DONK, 1979: Induction and effector phases of the immune response: physiological and pathological features.
Comp.Immun.Microbiol.Infect.Dis. 1, 229-242.

GRABAR, P., C.A. WILLIAMS, 1952: Méthode permettant l'étude conjugée des proprietés éléctrophorétriques et immunochimiques d'un mélange de proteines: application au serum sanguin.
Biochim.Biophys.Acta. 10, 193-194.

GREGORIADIS, G., D. PUTMAN, L. LOUIS, D. NEERUNJUN, 1974: Comparative effect and fate of non-entrapped and liposome-entrapped neuraminidase injected into rats.
Biochem.J. 140, 323-330.

GRIFFIN, F.M., 1980: Effects of soluble immune complexes on Fc receptor- and C3b receptor - mediated phagocytosis by macrophages.
J.exp.Med. 152, 905-919.

GROVES, M.L., W. GORDON, 1967: Isolation of a new glycoprotein-a and a γ-G globulin from individual cow milks.
Biochemistry 6, 2388.

GUERIN, L.F., C.A. MITCHELL, 1975: Antibody production in goat milk serum after virus instillation of goat mammary gland.
Canad.J.Microbiol. 21, 655-661.

HALSTEAD, S.B., E.J. O'ROURKE, 1977: Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody.
J.exp.Med. 146, 201-217.

HELENIUS, A., E. FRIES, J. KARTENBECK, 1977: Reconstitution of Semliki forest virus membrane.
J.Cell Biol.75, 866-880.

HOFFMANN, M.K., 1980: Macrophages and T cells control distinct phases of B cell differentiation in the humoral immune response in vitro.
J.Immunol. 125, 2076-2081.

HOLT, P.G., J.E. BATTY, 1980: Alveolar macrophages. V. Comparative studies on the antigen presentation activity of guinea-pig and rat alveolar macrophages.
Immunology 41, 361-366.

HOUSTON, W.E., C.E. PEDERSEN, JR., F.E. COLE, R.O. SPERTZEL, 1974: Effects of antigen-antibody complexes on the primary immune response of rhesus monkeys. Infect.Immun. 10, 437-442.

JONES, T.C., 1975: Attachment and ingestion phases of pagocytosis. In: Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology. Hrsg. R. van Furth, S. 269-282, Blackwell, Oxford.

KELLER, R., 1977: Immunologie und Immunpathologie. Thieme-Verlag, Stuttgart.

KEMLER, R., H. MOSSMANN, K. STROHMAIER, B. KICKHÖFEN, D.K. HAMMER, 1975: In vitro studies on the selective binding of IgG from different species to tissue sections of the bovine mammary gland. Europ.J.Immunol. 5, 603-608.

KNUTSON, D.W., A. KIJLSTRA, L.A. VAN ES, 1977: Association and dissociation of aggregated IgG from rat peritoneal macrophages. J.exp.Med. 145, 1368-1381.

KRAMP, W.J., H.K. SIX, S. DRAKE, J.A. HASEL, 1979: Liposomal enhancement of the immunogenicity of adenovirus type 5 hexon and fiber vaccines. Infect.Immun. 25, 771-773.

LAISSUE, J., H. COTTIER, M.W. HESS, R.D. STONER, 1971: Early and enhanced germinal center formation and antibody responses in mice after primary stimulation with antigen-isologous antibody complexes as compared with antigen alone. J.Immunol. 107, 822-831.

LARSON, N.L., 1958: Transfer of specific blood serum proteins to lacteal secretions near parturition. J.Dairy Sci. 41, 1033-1044.

LAY, D.H., V. NUSSENZWEIG, 1969: Ca^{++} dependent binding of antigen 19S antibody complexes to macrophages.
J.Immunol. 102, 1172-1178.

MACH, J.P., J.J. PAHUD, 1971: Secretory IgA, a major immunoglobulin in most bovine external secretions.
J.Immunol. 106, 552-563.

MANNIK, M., W.P. AREND, 1971: Fate of preformed immune complexes in rabbits and rhesus monkeys.
J.exp.Med. 134, 19-31.

MANNIK, M., W.P. AREND, A.P. HALL, B.C. GILLILAND, 1971: Studies on antigen-antibody complexes.
I. Elimination of soluble complexes from rabbit circulation.
J.exp.Med. 133, 713-739.

MANTOVANI, B., 1981: Phagocytosis of immune complexes mediated by IgM and C3 receptors by macrophages from mice treated with glycogen.
J.Immunol. 126, 127-130.

MANTOVANI, B., M. RABINOVICH, V. NUSSENZWEIG, 1972: Phagocytosis of immune complexes by macrophages.
J.exp.Med. 135, 780-792.

MAYR, A., 1974: Immunpathogene Folgen einer Virusinfektion.
Immunität und Infektion 2, 146-153.

MAYR, A., R. BRUNNER, 1980: Untersuchungen über die Wirksamkeit einer Paramunisierung zur Bekämpfung von Ferkelaufzuchtverlusten und der enzootischen Pneumonie der Schweine (Ferkelgrippe).
Zbl.Vet.Med. B, 27, 589-598.

MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK, G. WITTMANN, 1977: Virologische Arbeitsmethoden. II.
Fischer Verlag, Jena.

McBRIDE, R.A., L.W. SCHIERMAN, 1971: Passive antibody and the immune response. Factors which determine enhancement and suppression.
J.exp.Med. 134, 833-845.

McDOWELL, G.H., A.K. LASCELLES, 1971a: Local immunization of ewes with staphylococcal cell and cell-toxoid vaccines.
Res.vet.Sci. 12, 258-264.

McDOWELL, G.H., A.K. LASCELLES, 1971b: Local production of antibody by the lactating mammary gland of the ewe and the effect of systemic immunization.
Res.vet.Sci. 12, 113-118.

MEBUS, C.A., N.R. UNDERDAHL, M.B. RHODES, M.J. TWIEHAUS, 1969: Calf diarrhea (scours) reproduced with a virus from a field outbreak.
Univ.Nebr.Res.Bull. 233, 1-16.

MEBUS, C.A., R.G. WHITE, E.P. BASS, et al., 1973: Immunity to neonatal calf diarrhea virus.
J.Amer.Vet.Med.Ass. 163, 880-883.

MICHL, J., M.M. PIECZONKA, J.C. UNKELESS, S.C. SILVERSTONE, 1979: Effects of immobilized immune complexes on Fc- and complement-receptor function in resident and thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages.
J.exp.Med. 150, 607-621.

MITCHELL, C.A., L.F. GUERIN, A.E. PASIEKA, 1967: Antibody production in milk serum after virus instillation of goat mammary gland.
Canad.J.Microbiol. 13, 1069-1078.

MÖLLER, G., A. COUTINHO, 1975: Role of C3 and Fc receptors in B lymphocyte activation.
J.exp.Med. 141, 647-663.

MORETTA, L., S.R. WEBB, C.E. GROSSI, P.M. LYDYARD, M.D. COOPER, 1977: Functional analysis of two human T-cell subpopulations: help and suppression of B-cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG.
J.exp.Med. 146, 184-199.

MORGAN, E.L., C.H. TEMPELIS, 1977: The role of antigen-antibody complexes in mediating immunologic unresponsiveness in the chicken.
J.Immunol. 119, 1293-1298.

MORGAN, E.L., M.L. THOMAN, S.M. WALKER, W.O. WEIGLE, 1980: Regulation of the immune response. II. Characterization of the cell population(s) involved in the Fc fragment - induced adjuvant effect.
J.Immunol. 125, 1275-1279.

MORGAN, E.L., W.O. WEIGLE, 1980a: Polyclonal activation of murine B lymphocytes by Fc fragments. III. Characterization of the defect in the ability of the C3H/HeJ mouse to respond to Fc fragments.
J.Immunol. 125, 2467-2472.

MORGAN, E.L., W.O. WEIGLE, 1980b: Regulation of Fc fragment-induced murine spleen cell proliferation.
J.exp.Med. 151, 1-11.

NADLER, P.I., R.J. KLINGENSTEIN, L.K. RICHMAN, G.B. AHMANN, 1980: The murine Kupffer cell. II. Accessory cell function in in vitro primary antibody-responses, mitogen-induced proliferation, and stimulation of mixed lymphocyte responses.
J.Immunol. 125, 2521-2525.

NEWBY, T.J., J. BOURNE, 1977: The nature of the local immune system of the bovine mammary gland.
J.Immunol. 118, 461-465.

NORCROSS, N.L., L. DODD, D.M. STARK, 1968: Use of the mouse protection test to assay streptococcic antibodies in bovine serum and milk.
Amer.J.Vet.Res. 29, 1201-1205.

NOTKINS, L.A., 1971: Infectious virus - antibody complexes: interaction with anti-immunoglobulin, complement and rheumatoid factor.
J.exp.Med. 134, 41s-51s.

NUSSENZWEIG, V., 1974: Receptors for immune complexes on lymphocytes.
Adv. Immunol. 15, 217-258.

OLDSTONE, M.B.A., N.R. COOPER, D.L. LARSON, 1974: Formation and bologic role of polyoma virus - antibody complexes. J.exp.Med. 140, 549-565.

OUTTERIDGE, P.M., R.C. WILLIAMS, A.K. LASCELLES, 1968: Local immunity in the mammary gland following the infusion of a staphylococcal cell-toxoid vaccine. Res.vet.Sci. 9, 416-423.

PARASKEVAS, F., S.-T. LEE, K.B. ORR, L.G. ISRAELS, 1972: A receptor for Fc on mouse B-lymphocytes. J.Immunol. 108, 1319-1327.

PEIRIS,J.S.M., S. GORDON, J.C. UNKELESS, J.S. PORTERFIELD, 1980: Monoclonal anti-Fc receptor IgG blocks antibody enhancement of viral replication in macrophages. Nature 289, 189-191.

PHILLIPS-QUAGLIATA, J.M., B.B. LEVINE, F. QUAGLIATA, J.W. UHR, 1970: Mechanisms underlying binding of immune complexes to macrophages. J.exp.Med. 133, 589-601.

PIERCE, C.W., J.A. KNAPP, D.D. WOOD, B. BENACERRAF, 1974: Immune responses in vitro. X. Functions of macrophages. J.Immunol. 112, 1181-1189.

PLOTZ, P.H., R.P. KIMBERLY, R.L. GUYER, D.M. SEGAL, 1979: Stable model immune complexes produced by bivalent affinity labeling haptens: in vivo survival. Molec.Immunol. 16, 721-729.

PORTER, P., 1972: Immunoglobulins in bovine mammary secretions. Quantitative changes in early lactation and absorption by the neonatal calf. Immunology, 23, 225-238.

PORTER, P., W.D. ALLEN, 1972: Classes of immunoglobulins related to immunity in the pig. J.Amer.Vet.Med.Ass. 160, 511-518.

RAGSDALE, C.G., W.P. AREND, 1980: Loss of Fc Receptor activity after culture of human monocytes on surface - bound immune complexes.
J.exp.Med. 151, 32-44.

ROUBIN, R., S. ZOLLA-PAZNER, 1979: Markers of macrophages heterogeneity. I. Studies of macrophages from various organs of normal mice.
Europ.J.Immunol. 9, 972-978.

RUNDELL, B.B., R.F. BETTS, 1980: Physical properties of cytomegalovirus immune complexes prepared with IgG neutralizing antibody, anti-IgG and complement.
J.Immunol. 124, 337-342.

SANCHEZ, Y., I. IONESCU-MATIU, G.R. DREESMAN, W. KRAMP, H.R. SIX, F.B. HOLLINGER, J.L. MELNICK, 1980: Humoral and cellular immunity to hepatitis B virus-derived antigens: comparative activity of Freund complete adjuvant, alum, and liposomes.
Infect.Immun. 30, 728-733.

SCHREINER, G.F., E.R. UNANUE, 1977: Capping and the lymphozyte: models for membrane reorganization.
J.Immunol. 119, 1549-1551.

SCHUHMACHER, B., 1980: Serologische Untersuchungen mittels ELISA über das Vorkommen von Rotavirus-Antikörpern in Blut, Kolostrum und Milch frischlaktierender Kühe, unter besonderer Berücksichtigung von Kälbern in Enteritis-Betrieben.
Vet.Med.Diss., München

SIEGEL, R.D., R.E. CATHOU, 1980: Conformation of immunoglobulin M. III. Structural requirements of antigen for complement fixation by equine IgM.
J.Immunol. 125, 1910-1915.

SILVERSTEIN, S.C., 1975: The role of mononuclear phagocytes in viral immunity. In: Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology. Hrsg. R. van Furth, S. 557-568, Blackwell, Oxford.

SISSONS, J.G.P., M.B.A. OLDSTONE, 1980: Killing of virus-infected cells: the role of antiviral antibody and complement in limiting virus infection. J.infect.Dis., 142, 442-448.

SNODGRASS, D.R., K.J. FAHEY, P.W. WELLS, I. CAMPBELL, A. WHITELAW, 1980: Passive immunity in calf rotavirus infections: maternal vaccination increases and prolonges immunoglobulin G 1 antibody secretion in milk. Infect.Immun. 28, 344-349.

SNODGRASS, D.R., P.W. WELLS, 1978: Passive immunity in rotaviral infections. J.Amer.vet.med.Ass. 173, 565-569.

SODERBERG, L.S.F., A.H. COONS, 1978: Complement-dependent stimulation of normal lymphocytes by immune complexes. J.Immunol. 120, 806-811.

STEINMAN, R.M., Z.A. COHN, 1975: Binding of soluble proteins and particulate immune complexes to macrophages. In: Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology. Hrsg. R. van Furth, S. 733-751, Blackwell, Oxford.

STOKES, C.R., E.T. SWARBRICK, J.F. SOOTHILL, 1980: Immune elimination and enhanced antibody responses: functions of ciruclating IgA. Immunology 40, 455-458.

STONER, R.D., G. TERRES, 1963: Enhanced antitoxin responses in irradiated mice elicited by complexes of tetanus toxoid and specific antibody. J.Immunol. 91 761-770.

SULICA, A., M. GHERMAN, C. MEDESAN, V. GHETJE, J. SJÖQUIST, 1979: IgG-binding sites on macrophage cell membrane. II. Mobility of Fc receptors induced by the interaction with their corresponding IgG ligands. Europ.J.Immunol. 9, 985-990.

TERRES, G., G.S. HABICHT, R.D. STONER, 1974: Carrier-specific enhancement of the immune response using antigen-antibody complexes.
J.Immunol. 112, 804-811.

TERRES, G., S.L. MORRISON, G.S. HABICHT, R.D. STONER, 1972: Appearence of an early "primed state" in mice following the concomitant injections of antigen and specific antiserum.
J.Immunol. 108, 1473-1481.

TERRES, G., W. WOLLINS, 1961: Enhanced immunological sensitization of mice by the simultaneous injection of antigen and specific antiserum.
J.Immunol. 86 361-368.

THEOPHILOPOULOS, A.N., F.J. DIXON, 1979: The biology and detection of immune complexes.
Adv.Immunol. 28, 89-221.

TOMASI, Jr. T.B., J. BIENENSTOCK, 1968: Secretory immunoglobulins.
Adv.Immunol. 9, 1-97.

UNANUE, E.R., 1975: The regulation of the immune response by macrophages. In: Mononucelar phagocytes in immunity, infection and pathology. Hrsg. R. van Furth, S. 722-738, Blackwell, Oxford.

UNKELESS, J.C., H.N. EISEN, 1975: Binding of monomeric immunoglobulins to Fc receptors of mouse macrophages.
J.exp.Med. 142, 1520-1533.

VAN SNICK, J.L., P.L. MASSON, 1978: The effect of complement on the ingestion of soluble antigen-antibody complexes and IgM aggregates by mouse peritoneal macrophages.
J.exp.Med. 148, 903-914.

WATSON, D.L., A.K. LASCELLES, 1975: The influence of systemic immunization during mammary involution on subsequent antibody production in the mammary gland.
Res.vet.Sci. 18, 182-185.

WELLEMANS, G., E.V. OPDENBOSCH, D.L. BRABANDER et al., 1979: Prévention de la diarrhoe néonatale des veaux par la prolongation de la sécrétion d'anticorps a un haut niveau dans le lait maternal.
Bull.Off.Int.Epiz. (im Druck)

WELLS, P.W., D.R. SNODGRASS, J.A. HERRING, A.M. DAWSON, 1978: Antibody titres to lamb rotavirus in colostrum and milk of vaccinated ewes.
Vet.Rec. 103, 46-48.

WODA, B.A., J.P. BALINT, J.D. FELDMAN, 1980: Recognition of immune complexes and antigen in vivo.
J.Immunol. 125, 1011-1016.

WOODE, G.N., J. JONES, J. BRIDGER, 1975: Levels of colostral antibodies against neonatal calf diarrhoea virus.
Vet.Rec. 97, 148-149.

Lebenslauf

Am 14. März 1954 würde ich, Werner Helmut Eichhorn, als erster Sohn des Schlossers Werner Eichhorn und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Rosenbeck, in Penzberg geboren.

1960 - 1964	Volksschule Penzberg
1964 - 1973	Neusprachliches Gymnasium in Tutzing
1973 - 1974	Grundwehrdienst
1974 - 1979	Studium der Tiermedizin in München
13. 12. 1979	Staatsexamen
Januar 1980	Beginn der vorliegenden Doktorarbeit
11. 02. 1980	Approbation als Tierarzt
10. 05. 1980	Heirat mit der Gymnastiklehrerin Jutta, geb. Helbig

Herrn Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr danke ich herzlich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. P. A. Bachmann gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und seine stete Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. K. Osterkorn, Institut für Tierzucht, danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Besonders danke ich Herrn Dr. Plank, Tiergesundheitsdienst Grub, Herrn Passauer vom Staatsgut Achselschwang, Herrn Eder vom Primusgut Adelholzen sowie Herrn Heininger vom Gut Erlenhof für die Hilfe bei der Probengewinnung.

Bei allen Mitarbeitern der Isolierabteilung, besonders bei Herrn Dr. R. G. Hess, bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung.